

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

RAFAEL MAZER ETTO

**ANÁLISE MUTAGÊNICA DO DOMÍNIO REGULATÓRIO N-
TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE**
Herbaspirillum seropedicae

**CURITIBA
2006**

RAFAEL MAZER ETTO

**ANÁLISE MUTAGÊNICA DO DOMÍNIO REGULATÓRIO N-
TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE**
Herbaspirillum seropedicae

Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau de
mestre, pelo Curso de Pós-graduação
em Bioquímica, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadoras: Profa. Dra. Maria
Berenice Reynaud Steffens;
Profa. Dra. Leda Satie Chubatsu.

**CURITIBA
2006**

E85 Etto, Rafael Mazer
Análise mutagênica do domínio regulatório N-terminal da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae* / Rafael Mazer Etto ; orientação : Maria Berenice Reynaud Steffens, Leda Satie Chubatsu. – Curitiba, 2006.
p. ; 21 cm

Inclui bibliografias
Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

1. Bioquímica. 2. Microorganismos fixadores de nitrogênio. 3. Bactérias - Fisiologia. I. Steffens, Maria Berenice Reynaud. II. Chubatsu, Leda Satie. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD 574.192

RAFAEL MAZER ETTO

**ANÁLISE MUTAGÊNICA DO DOMÍNIO REGULATÓRIO N-
TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE**
Herbaspirillum seropedicae

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica** no **Programa de Pós-graduação em Bioquímica (Ciências)** da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 02 de fevereiro de 2006.

Profa. Dra. Leda Satie Chubatsu
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Berenice R. Steffens
Universidade Federal do Paraná
Orientadora

Profa. Dra. Cynthia Maria Teles Fadel
Pichet
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Rose Adele Monteiro
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Leda Satie Chubatsu
Universidade Federal do Paraná
Orientadora

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Universidade Federal do Paraná

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade e formação de qualidade. Agradeço também ao apoio financeiro do CNPq, CAPES, FUNPAR, SETI e PRONEX/96 (CNPq/FINEP/PADCT).

Ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e à Prof. Dra. Glaci Zancan pelos exemplos de eficiência e dedicação à pesquisa.

Às minhas orientadoras, Prof. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens e Prof. Dra. Leda Satie Chubatsu, pela confiança, ensinamentos, conselhos e amizade importantes para meu crescimento profissional e fundamental para a realização desta dissertação.

À Prof. Dra. Rose Adele Monteiro, pela amizade e ajuda no decorrer deste projeto e aos demais professores do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da UFPR.

À Dona Julieta, Roseli Prado e ao Valter pela grande amizade e eficiência nos trabalhos a eles requisitados.

Aos colegas e amigos de laboratório.

À minha família e a Deus.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é um microrganismo pertencente à subdivisão β das Proteobactérias que promove o crescimento vegetal. Esta bactéria associa-se com gramíneas de interesse econômico como cana-de-açúcar, arroz, milho e sorgo e, fixa nitrogênio sob condições de microaerobiose e ausência de íons amônio. A regulação da expressão dos genes que codificam proteínas/enzimas envolvidas na fixação biológica de nitrogênio (genes *nif*) é dependente do controle da síntese e da atividade da proteína NifA, um ativador transcricional de promotores σ^N dependentes. A proteína NifA apresenta três domínios estruturais: o domínio C-terminal com um motivo hélice-volta-hélice altamente conservado e responsável pela ligação ao DNA; o domínio Central possui um motivo de ligação de ATP e envolvido na interação com a subunidade sigma da RNA polimerase e na formação o complexo aberto; e o domínio N-terminal, que apresenta o domínio GAF, provavelmente envolvido no controle por amônio, uma vez que a proteína sem este domínio é ativa na ausência de oxigênio, independente dos níveis de amônio. Para identificar os resíduos de aminoácidos envolvidos no mecanismo de controle da atividade de NifA dependente por amônio pelo domínio N-terminal, foram realizados experimentos de mutagênese sítio-dirigida deste domínio após a comparação da sequência de aminoácidos da NifA de *H. seropedicae*, *Azospirillum brasilense* e *Rhodobacter capsulatus*. Os resultados obtidos mostraram que a inserção de diferentes mutações no domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae* não aumentou sua solubilidade. No entanto, dois dos mutantes (L52Q e o tetra mutante) perderam a capacidade inibitória sobre a atividade da NifA N-truncada na presença de 20mmol/L de amônio, enquanto que para o mutante Y18F esta perda foi parcial. Os resultados apresentados neste trabalho reforçam, portanto, a hipótese de que a regulação por amônio da proteína NifA pode estar relacionada a aminoácidos específicos presentes no domínio N-terminal.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*; Proteína NifA; Fixação de Nitrogênio.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae, which belongs to the β subdivision of Proteobacteria, is a plant growth-promoting bacterium that colonizes the inner tissues of Gramineae of economic importance such as sugarcane, rice, corn and sorghum. This bacterium fixes nitrogen under microaerobic conditions and in the absence of ammonia. The nitrogen fixation processes involves the expression of *nif* genes and requires a specific transcriptional activator, the NifA protein. NifA has a domain structure that is similar to other members of the enhancer-binding protein family in which a central, conserved AAA+ ATPase domain is flanked by a C-terminal DNA-binding domain and an N-terminal regulatory domain. The C-terminal domain contains a helix-turn-helix motif highly conserved and involved in DNA-binding; the Central-domain has two potential ATP-binding sites and is responsible for interaction with the σ^N -RNA polymerase complex and the N-terminal domain contains the GAF motif, and it is probably involved in ammonium regulation since an N-truncated protein is active, responds toward oxygen levels, but misses the control by fixed nitrogen. The N-terminal domain has a low similarity among NifA proteins. In order to investigate the mechanisms of control by ammonium, point mutations were carried out on the N-terminal domain to suppress its inhibitory function. Comparison of *Azospirillum brasiliense*, *Rhodobacter capsulatus*, and *H. seropedicae* NifA proteins was used in order to change specific amino acid residues to those with different polarity or different side chain size. Our results showed that mutations on the *Herbaspirillum seropedicae* NifA N-terminal domain do not increased the over-expressed protein solubility. Replacement of the tyrosine residue by phenylalanine at position 18 resulted in a partial lost of the inhibitory capability of the N-terminal domain. However, two mutants (L52Q and tetra-mutant) completely lost its inhibitory capability in response to ammonium (20mmol/L). Our results confirm the hypothesis that NifA protein regulation by ammonium is dependent of specific amino-acids residues located in the N-terminal domain.

Key-words: *Herbaspirillum seropedicae*, NifA Protein; Nitrogen Fixation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO DA PROTEÍNA-FE DA NITROGENASE	16
FIGURA 2	- COMPARAÇÃO DA CASCATA REGULATÓRIA CONTROLADORA DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>nif</i> em <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. meliloti</i> E <i>B. japonicum</i>	21
FIGURA 3	- ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIAO PROMOTORA DO GENE <i>nifA</i> DE <i>H. seropedicae</i>	22
FIGURA 4	- ESQUEMA REPRESENTANDO A ESTRUTURA DA PROTEÍNA NifA DE <i>H.seropedicae</i> ...	25
FIGURA 5	- COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO DOMÍNIO N-TERMINAL DAS PROTEÍNAS NIFA DE <i>A. brasilense</i> , <i>R. capsulatus</i> e <i>H. seropedicae</i>	54
FIGURA 6	- ESQUEMA GERAL DA ESTRATÉGIA DE MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA UTILIZANDO “PRIMERS” MUTAGÊNICOS COMPLEMENTARES	57
FIGURA 7	- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DAS DUAS PRIMEIRAS PCRs PARA AS TROCAS DOS RESÍDUOS DE L52 POR Q E Y18 POR F	58
FIGURA 8	- ESQUEMA GERAL DA ESTRATÉGIA DE MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA UTILIZANDO “MEGAPRIMERS” MUTAGÊNICOS	60
FIGURA 9	- ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DAS DUAS PRIMEIRAS PCRs PARA AS TROCAS DOS RESÍDUOS DE V40 E V138 POR E	61
FIGURA 10	- ESQUEMA DE CLONAGEM DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS DA PROTEÍNA NIFA <i>H. seropedicae</i> NO VETOR pGEM-T	64
FIGURA 11	- ESQUEMA DE CLONAGEM DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS MUTANTES DA PROTEÍNA NIFA <i>H. seropedicae</i> NO VETOR pET28a	67
FIGURA 12	- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pETLET	68
FIGURA 13	- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pETLET	69
FIGURA 14	- ESQUEMA DE CLONAGEM DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS DA PROTEÍNA NIFA <i>H. seropedicae</i> NO VETOR pDK7	71
FIGURA 15	- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pDKLET	72
FIGURA 16	- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pDKLET	73
FIGURA 17	- ESQUEMA DE CLONAGEM DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS DA PROTEÍNA NIFA <i>H. seropedicae</i> NO VETOR pT7-7	75
FIGURA 18	- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pT7LET	76
FIGURA 19	- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE	77

		pT7LET	
FIGURA 20	-	ANÁLISE DOS EXTRADOS CELULARES UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE β -GALACTOSIDASE	81
FIGURA 21	-	IMUNODETECÇÃO DO DOMÍNIO N-TERMINAL E DA PROTEÍNA NIFA N-TRUNCADA DE <i>H. seropedicae</i> EXPRESSA EM <i>E. coli</i>	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	-	BACTÉRIAS	33
TABELA 2	-	PLASMÍDEOS	34
TABELA 3	-	LISTA DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS CULTIVOS DE BACTÉRIAS	38
TABELA 4	-	OLIGONUCLEOTÍDEOS EMPREGADOS PARA MUTAGENIZAR O DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NIFA DE <i>H. seropedicae</i>	40
TABELA 5	-	CÓDONS ALTERADOS PARA OS ESTUDOS DE MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA	55
TABELA 6	-	EFEITO DA CO-EXPRESSÃO DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS MUTANTES SOBRE O DOMÍNIO CENTRAL+C-TERMINAL (N-TRUNCADA) DE <i>H. seropedicae</i> EM <i>E. coli</i> .	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	- Absorbância
ADP	- 5' difosfato de adenosina
Amp ^R	- resistência à ampicilina
Atase	- enzima adenililtransferase
ATP	- 5' trifosfato de adenosina
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DNTPs	- 5'trifosfato de 2'desoxinucleotideo
DraG	- dinitrogenase reductase glicohidrolase
DraT	- dinitrogenase ADP-ribosil transferase
e-	- elétron
EDTA	- ácido etilenodiamino-tetra ético
g	- grama
GDH	- glutamato desidrogenase
GOGAT	- glutamato sintase
GS	- glutamina sintetase
IHF	- Fator de integração do hospedeiro
IPTG	- β-isopropil-tiogalactopiranosídeo
Km ^R	- resistência a canamicina
L	- litro
m/v	- Massa volume
N ₂ ase	- nitrogenase
NAD ⁺	- nicotinamida-adenina dinucleotideo oxidado
NADPH	- fosfato nicotinamida-adenina dinucleotideo reduzido
NaI ^R	- resistência ao acido nalidixico
nm	- comprimento de onda em nanometro
pb	- pares de base
PCR	- reação em cadeia da polimerase
Pi	- fosfato inorgânico
RBS	- sítio de ligação de ribossomo
Rpm	- rotação por minuto

SDS	- dodecilsulfato de sódio
Sm ^R	- resistência à estreptomicina
Utase	- enzima uridililtransferase
X-gal	- 5-bromo-4-cloro-3-indolína β-D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 AUMENTO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA E O MEIO AMBIENTE.....	12
1.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	14
1.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	14
1.4 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	18
1.4.1 Regulação da Transcrição do Gene <i>nifA</i>	19
1.4.2 A Proteína NifA.....	23
1.4.3 Controle da Atividade da Proteína NifA.....	25
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	33
4.2 REAGENTES.....	35
4.3 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	35
4.4 ANTIBIÓTICOS	37
4.5. MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DA REGIÃO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA.....	38
4.6 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA ESCALA	39
4.7 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA A VETORES.....	41
4.7.1 Clonagem no vetor pGEM-T	41
4.7.2 Clonagem em vetores de expressão.....	41
4.8 SEQUENCIAMENTO DE DNA	42
4.8.1.Preparo do Material para Seqüenciamento.....	42
4.8.2.Reação de Seqüenciamento	42
4.8.3 Análise da Seqüência de DNA	43
4.9. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	43
4.9.1. Preparo de Células Eletrocompetentes.....	43
4.9.2 Transformação Bacteriana	44
4.9.3 Estocagem das <i>E. coli</i> Transformadas com os Vetores deste Trabalho ...	44
4.10. SEPARAÇÃO DE MOLÉCULAS POR ELETROFORESE.....	44
4.10.1 Eletroforese de DNA	44
4.10.2 Purificação de DNA através de Eletroforese em Gel de Baixo Ponto de Fusão	45
4.10.3 Eletroforese de Proteína (SDS-PAGE).....	45
4.11. EXPRESSÃO DAS FORMAS NATIVAS E MUTANTES DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS DA PROTEÍNA NIFA DE <i>H. seropedicae</i>	46
4.12 ANÁLISE FISIOLÓGICA DAS FORMAS MUTADAS DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS DA PROTEÍNA NIFA DE <i>H. seropedicae</i>	47
4.12.1 Adequação das Condições Fisiológicas de Cultivo	47
4.12.2 Determinação da Atividade de β -galactosidase	47
4.13 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	48
4.14 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO ANTICORPOS POLICLONAIS.....	49
4.14.1 Obtenção de Anticorpos Policlonais (anti-N-terminal e N-truncada)	49
4.14.2 Remoção de Anticorpos Inespecíficos do Soro.....	49
4.14.3 “IMMUNOBLOTTING”	50

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA.....	55
5.1.1 Obtenção de Mutantes Utilizando “Primers” Mutagênicos Complementares	55
5.1.2 Obtenção de Mutantes Utilizando “Megaprimers”	58
5.2 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS MUTAGENIZADOS EM VETOR PARA SEQUENCIAMENTO.....	62
5.3 EXPRESSÃO DO DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA SELVAGEM E DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS MUTANTES	65
5.3.1 Expressão do Domínio N-terminal a partir do Vetor pET28a	65
5.3.2 Expressão dos Domínios N-terminais a partir do vetor pDK7	70
5.3.3 Expressão dos Domínios N-terminais a partir do Vetor pT7-7	74
5.4 ANÁLISE FUNCIONAL DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS MUTANTES	78
6 CONCLUSÕES	89
7 REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 AUMENTO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA E O MEIO AMBIENTE

Nos últimos 50 anos tem se observado um grande aumento na produção de grãos mundial e paralelamente a isto tem se notado um aumento significativo no uso de fertilizantes nitrogenados. Sabe-se que, o uso indiscriminado destes fertilizantes pode causar sérios danos ao meio ambiente, entre eles a perda de NO₂ para a atmosfera, chuva ácida, mudanças no ciclo global do nitrogênio, contaminação dos lençóis freáticos, eutrofização das águas e acidificação do solo devido à deposição de nitrogênio. Além disso, pode ocorrer um aumento da competição entre os vegetais devido aos altos níveis de N disponíveis, podendo afetar a diversidade de espécies (GRAHAM & VANCE, 2000).

Na natureza, a conversão do nitrogênio atmosférico em amônio por bactérias de vida livre ou associativa é muito importante para o meio ambiente e consequentemente para a agricultura mundial. Este processo é conhecido por fixação biológica de nitrogênio e tem função de destaque no ciclo do nitrogênio por repor o nitrogênio da biosfera e compensar baixas contraídas pela sua própria denitrificação. A disponibilidade de nitrogênio fixado é freqüentemente o fator limitante para a produtividade agrícola e tem gerado grande demanda na agricultura global para garantir constante aumento da produção de alimentos, tendo em vista o grande aumento da população mundial no século XXI (DIXON & KAHN, 2004). Além disso, o nitrogênio fixado biologicamente é usado diretamente pela planta, e assim é menos suscetível à volatilização, denitrificação e lixiviação (GRAHAM & VANCE, 2000).

Para o cultivo de soja no Brasil, recomenda-se a utilização de inoculantes sem a suplementação com qualquer fonte de fertilizante nitrogenado, pois as estirpes de *Bradyrhizobium* selecionadas (diazotrofo que se associam as leguminosas) conseguem fornecer o nitrogênio necessário para o desenvolvimento das plantas. Além disso, a fixação biológica de nitrogênio é fundamental nos solos com taxas de mineralização de nitrogênio escassas, uma vez que esse nutriente é requerido em maior quantidade nesta cultura. Estima-se que para produzir 1000 kg

de grãos são necessários 80 kg de nitrogênio (<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/inoculacao.htm>).

A utilização de organismos diazotrofos nas lavouras de gramíneas com potencial utilização como energia renovável, ganha destaque por dispensar a utilização de gás natural para a produção de adubos nitrogenados (FAIRBANKS, 2004). Esta aplicação vai de encontro com a proposta de um desenvolvimento sustentável, que leva à associação entre meio ambiente e o desenvolvimento, onde a produção e o uso de energia renovável têm importância fundamental. A partir do início da década de 70, com a crise mundial do petróleo, a produção de etanol a partir de açúcares fermentescíveis de fontes renováveis de energia, despontou como a mais viável para substituir os combustíveis derivados de petróleo. Além disso, a produção de etanol provocaria impactos econômicos-sociais de primeira grandeza, como a melhoria da renda rural, geração de empregos em larga escala, redução da dependência externa de petróleo e melhoria na balança comercial (NEGRÃO & URBAN et al., 2005).

A produção mundial de álcool aproxima-se dos 40 bilhões de litros, dos quais se presume que até 25 bilhões de litros sejam utilizados para fins energéticos. O Brasil responde por 15 bilhões de litros deste total. A cana-de-açúcar é a segunda maior fonte de energia renovável do Brasil, com 12,6% de participação na matriz energética atual, considerando-se o álcool combustível e a co-geração de eletricidade, a partir do bagaço (www21.sede.embrapa.br/a_embrapa/unidades_centrais/acs/publicações/institucional/Agroenergia.pdf). Um outro potencial produtor de energia renovável é a utilização do sorgo como matéria prima para a produção de etanol, devido ao fato deste se adaptar as condições climáticas diversas, apresentar um rápido crescimento, moderada exigência de água e elevado conteúdo de carboidrato (TEIXEIRA et al., 1988).

Dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) comprovam que a fixação biológica do nitrogênio atmosférico por bactérias diazotróficas em soja, feijão, ervilha e outras leguminosas trouxe vantagens econômicas e ambientais para o Brasil. Atualmente, a fixação biológica é empregada em cerca de 12 milhões de hectares de área plantada, reduzindo-se a importação de adubos nitrogenados. Apenas na soja, há uma economia de US\$ 3,0 bilhões a cada ano. Nas associações com cana-de-açúcar, a economia pode ser equivalente a US\$

200 milhões anuais ([http://www.embrapa.br/linhas_acao/temas/meio_ambiente / nitrogenio.htm](http://www.embrapa.br/linhas_acao/temas/meio_ambiente/nitrogenio.htm) ; <http://www21.sede.embrapa.br/noticias/artigos>)

1.2 *Herbaspirillum seropedicae*

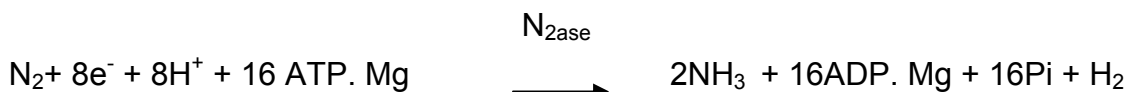
Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria gram-negativa vibrióide que pertence à subdivisão β das Proteobactérias. É um microrganismo diazotrofo endofítico que foi isolado em 1986 por BALDANI e colaboradores. A importância atribuída ao gênero *Herbaspirillum* provém da sua associação com gramíneas de interesse econômico como milho, sorgo e cana-de-açúcar (DOBEREINER, 1992). Em certas regiões produtoras de cana-de-açúcar do Brasil, por mais de cem anos não foi necessário utilizar adubação nitrogenada, sugerindo que o nitrogênio fixado biologicamente, principalmente pelos endofíticos *Herbaspirillum* spp. e *Acetobacter diazotrophicus*, possa ter contribuído de maneira significativa para o metabolismo nitrogenado da planta (DOBEREINER, 1992). Além disso, estudos realizados por OLIVARES e colaboradores (1997) indicaram que o *H. seropedicae* pode fornecer fitormônios para a planta, favorecendo dessa forma, seu desenvolvimento.

A infecção por *H. seropedicae* ocorre através da ligação da bactéria à superfície da planta, seguida de proliferação preferencialmente nas raízes secundárias e ferimentos, penetração e espalhamento da bactéria através dos espaços intercelulares e feixes vasculares das partes aéreas com subsequente colonização e estabelecimento nos vasos do xilema (OLIVARES et al., 1995). Estudos realizados por Roncato-Maccari e colaboradores (2003) demonstraram que durante a associação deste diazotrofo com espécies de gramíneas ocorre a expressão dos genes *nifH* que codifica para a proteína Fe da enzima nitrogenase.

1.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Todos os seres vivos necessitam de nitrogênio para a biossíntese de importantes macromoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Contudo o solo

contém pouco nitrogênio na forma assimilável e o nitrogênio atmosférico, embora abundante, não é assimilado diretamente pela maioria dos seres vivos. Os microrganismos diazotróficos são os únicos capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico (N₂) a amônia (NH₃), processo denominado fixação biológica de nitrogênio. A fixação do nitrogênio é catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase (POSTGATE, 1998), cuja reação geral é a seguinte:



Esse processo ocorre em condições especiais: baixas concentrações de nitrogênio fixado, baixas tensões de oxigênio, presença de metais e temperatura adequada (POSTGATE, 1998).

O complexo nitrogenase é uma metaloenzima constituída por duas proteínas distintas, a dinitrogenase redutase ou proteína ferro (proteína-Fe), que funciona como um doador de elétron para a segunda proteína, a dinitrogenase ou proteína ferro-molibdênio (proteína-FeMo), que contém o sítio catalítico da enzima. Estas unidades reunidas na presença de ATP e de uma fonte de baixo potencial de redução catalizam a redução de N₂ a amônia (POSTGATE, 1998). No entanto em condições de depleção de molibidênio alguns diazotrofos, como por exemplo, *Azotobacter vinelandii* e *Rhodobacter capsulatus*, induzem a síntese de nitrogenases alternativas contendo o co-fator Fe-vanádio ou Fe-Fe (EADY et al., 1996).

O mecanismo de redução de N₂ pela enzima nitrogenase requer a redução do agrupamento [4Fe-4S] da proteína Fe por doadores de elétrons como a ferredoxina e flavodoxina. Uma vez reduzida, a proteína Fe transfere seu elétron para a proteína Fe-molibdênio (que é dependente da hidrólise de MgATP). Finalmente o elétron é transferido internamente para o grupo P para o co-fator Fe-molibdênio do sítio catalítico (ligante do nitrogênio). Cada passo de transferência de elétron requer um ciclo obrigatório de associação e dissociação das proteínas Fe e Fe-molibdênio (HAGEMAN & BURRIS, 1978; SCHINDELIN et al., 1997; EINSLE et al., 2002; SEEFELDT, DANCE & DEAN, 2004) (Figura 1).

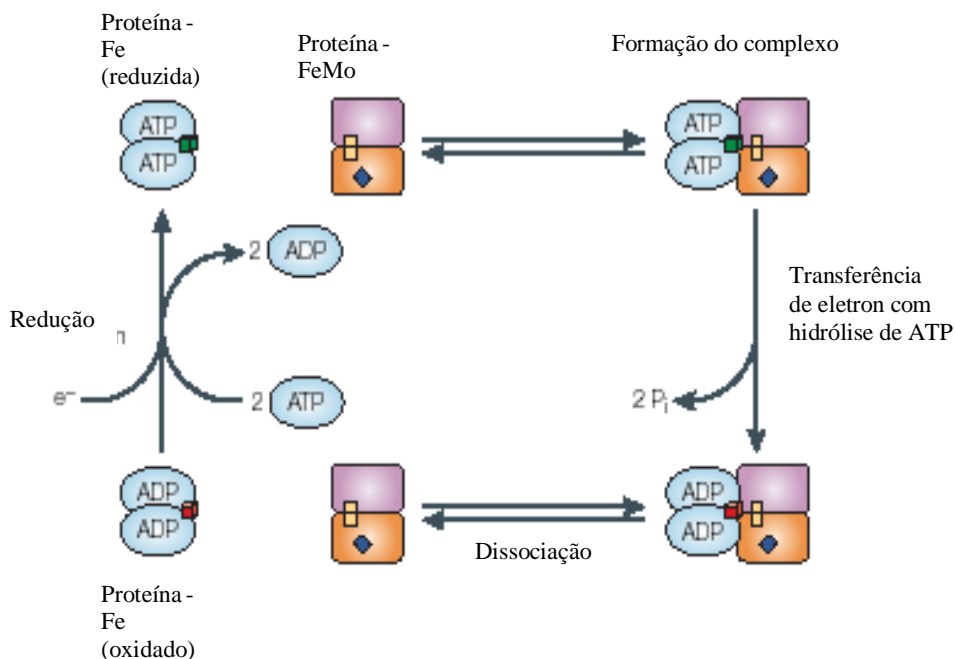
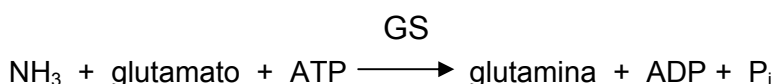


FIGURA 1 - Representação esquemática do ciclo da proteína-Fe da nitrogenase.

O dímero da proteína-Fe está representada em azul claro, com o cubo verde representando o agrupamento [4Fe-4S] reduzido e vermelho quando está oxidado. As subunidades α e β da proteína Fe-Mo estão representadas em laranja e roxo respectivamente, o quadrado em amarelo representa o grupo P e o retângulo azul representa o co-fator Fe-Mo. Mudanças no estado de oxidação da proteína Fe-Mo não são mostrados (FONTE: DIXON & KAHN, 2004).

A amônia é a fonte de nitrogênio preferida para o crescimento bacteriano, proporcionando uma maior taxa de crescimento se comparado a outras fontes nitrogenadas (MERRICK & EDWARDS, 1995). Embora a amônia seja sintetizada intracelularmente pela redução do nitrogênio, um transportador de alta afinidade de amônio conhecido como AmtB, tem sido encontrado em representantes dos membros das α , β e γ proteobactérias, onde em alguns casos localiza-se adjacente ao gene *glnK*, constituindo um operon, tendo a expressão aumentada sob condições limitantes de nitrogênio, e sua atividade controlada por GlnK (THOMAS et al., 2000, ARCONDÉGUY et al., 2001; ATKINSON & NINFA, 1998; COUTTS et al., 2002, JAVELLE et al., 2005 ; NOINDORF et al., 2006).

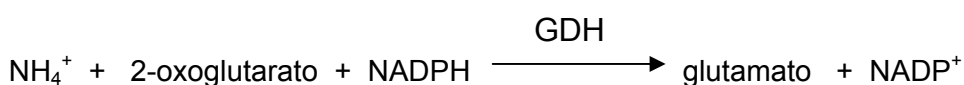
A amônia formada no processo de redução do N₂ atmosférico ou captada do meio externo é utilizada para a síntese de glutamina e glutamato. Na maioria das células, esses compostos servem como doadores de nitrogênio para reações biossintéticas. Em procariotos, a assimilação de amônia pode ocorrer por duas vias. A mais importante é a via glutamina sintetase / glutamato sintase (GS / GOGAT), onde a GS catalisa a conversão de glutamato e amônia em glutamina, e a GOGAT catalisa a transferência do grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato produzindo 2 moléculas de glutamato, uma reação dependente de NADPH. Ambas as reações são mostradas a seguir (MERRICK & EDWARDS, 1995):



A forma mais comum da GS é como uma enzima dodecamérica, com subunidades idênticas arranjadas como dois anéis hexagonais superpostos. Essa forma da GS, denominada GSI, é codificada pelo gene *glnA* e sua atividade é regulada por adenilação em resposta a um aumento nos níveis intracelulares de nitrogênio (YAMASHITA et al., 1989; FOOR, HASSEN & MAGASANIK, 1978).

A glutamato sintase, denominada anteriormente glutamina amida-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) é formada por duas subunidades distintas, as quais em *E. coli* são codificadas pelos genes *gltBD* (OLIVER et al., 1987).

Na outra via de assimilação de amônia, a glutamato desidrogenase (GDH) catalisa a conversão de amônia e 2-oxoglutarato em glutamato, uma reação também dependente de NADPH (MERRICK & EDWARDS, 1995):



Essa enzima é um hexâmero formado por subunidades idênticas codificadas pelo gene *gdhA* em *E. coli*. Uma vez que o sistema GS/GOGAT apresenta um K_M de 0,1mmol/L e a GDH, de 1mmol/L, a assimilação de nitrogênio por esta enzima é efetiva somente em concentrações elevadas de amônia. Portanto, a via da GDH é utilizada quando as células crescem na presença de excesso de nitrogênio fixado, enquanto a via GS/GOGAT, em condições limitantes (MERRICK & EDWARDS, 1995).

A assimilação de nitrogênio em enterobactérias envolve as seguintes proteínas: a glutamina sintetase ou GS (produto do gene *glnA*), a proteína PII ou GlnB codificada pelo gene *glnB*, a enzima uridililtransferase / uridilil-removedora (Utase/UR) ou GlnD codificada pelo gene *glnD*, a enzima adenililtransferase /adenilil-removedora (ATase) ou GlnE codificada pelo gene *glnE*. Essas enzimas interagem em um complexo mecanismo em cascata, controladas pela relação [2-oxoglutarato] / [glutamina]. Em condições limitantes de nitrogênio, onde essa relação é alta, o 2-oxoglutarato induz uma mudança conformacional na proteína GlnB, a qual adquire uma conformação ótima para a uridililação pela Utase. A proteína GlnB uridililada promove a desadenililação da GS pela Atase, ativando-a. Em condições de suficiência de nitrogênio, onde a relação [2-oxoglutarato] / [glutamina] é baixa, a UTase se liga à glutamina, o que inibe a atividade de uridililtransferase e leva a proteína a uma conformação que favorece a atividade uridilil-removedora, promovendo a desuridililação da GlnB. A proteína GlnB desuridililada estimula a adenilação da GS pela Atase, inativando-a (MERRICK & EDWARDS, 1995).

1.4 REGULAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Tendo em vista que o baixo tempo de renovação (“turnover”) da enzima nitrogenase, exige dos diazotrofos uma elevada síntese (acima de 20% do total de proteína na célula) e o alto custo energético do processo de redução do dinitrogênio à amônia, a síntese e a atividade da nitrogenase são estritamente regulada em resposta aos níveis de nitrogênio fixado (DIXON & KAHN, 2004).

Em alguns diazotrofos, como por exemplo, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* e *Azospirillum brasilense*, a regulação da enzima nitrogenase ocorre a nível pós-traducional. Nestes casos, a proteína DraT (dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase) promove a ADP-ribosilação da proteína Fe, inativando a nitrogenase em resposta aos níveis de amônio. Esta modificação covalente da nitrogenase é revertida por DraG (dinitrogenase redutase ativador da glicohidrolase), que remove a ADP-ribose da proteína Fe sob condições que são apropriadas para a fixação de nitrogênio (MASEPOHL et al., 2002 ; HALBLEIB et al., 2000; ZHANG et al., 1997). Estudos realizados com *A. brasilense* indicam que o controle das proteínas DraT e DraG em resposta ao nível de amônio envolve as proteínas GlnB e GlnZ respectivamente (KLASSEN et al., 2001; HUERGO et al., 2005).

As dificuldades de conciliar a fixação de nitrogênio com a presença de oxigênio se reflete em nível de expressão da nitrogenase, no qual o mecanismo de regulação ocorre também a nível transcricional dos genes *nif* (genes de fixação de nitrogênio). Em diazotrofos, os operons *nif* são transcritos a partir de promotores dependentes de σ^N ativados pela proteína NifA (LEE et al., 1993).

1.4.1 Regulação da Transcrição do Gene *nifA*

Embora existam diferentes cascatas regulatórias entre os diazotrofos, a NifA é uma proteína chave da fixação de nitrogênio por ser um ativador transcricional, que atua juntamente com o fator σ^N para iniciar o processo de transcrição dos genes responsáveis pela síntese da nitrogenase (*nif*). Deste modo observa-se uma regulação ao nível de expressão desta proteína (RUDNICK et al., 1997).

Em bactérias diazotróficas simbióticas, como por exemplo, *Sinorhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium japonicum* a transcrição do gene *nifA* é predominantemente controlada em resposta ao oxigênio, por um sistema de dois

componentes FixL-FixJ, ou por um sistema redox sensível RegS-RegR, respectivamente. (DIXON & KAHN, 2004)(Figura 2).

A proteína FixL de *S. meliloti* é uma histidina quinase, cuja estrutura é análoga a NifL, embora esta proteína não seja uma quinase. Ambas proteínas contêm um domínio PAS em sua região N-terminal que são comumente descritos como sensor de oxigênio e estado redox (TAYLOR & ZHULIN, 1999). No entanto a sensibilidade é diferente em cada caso, o domínio PAS de FixL contém um grupo prostético heme, enquanto NifL contém uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (GILLES-GONZALES et al., 1991; HILL et al., 1996). Na ausência de oxigênio, FixL se autofosforila e transfere o grupo fosforil para o domínio regulador de resposta da proteína FixJ, que passa então a ativar a transcrição de NifA. A ligação do oxigênio à molécula heme inibe a atividade quinase de FixL, regulando a transcrição de NifA (TUCKERMAN et al., 2002).

Em *B. japonicum*, a histidina quinase RegS contém um resíduo de cisteína conservado que é localizado na região entre o sítio de autofosforilação e o domínio ligante de ATP. Este resíduo é essencial para o sensoriamento redox, participando na formação de uma ligação dissulfeto intermolecular que converte o dímero ativo da proteína quinase para um tetrâmero inativo (DIXON & KAHN, 2004).

Em *Klebsiella pneumoniae*, diazotrofo de vida livre, o primeiro nível da cascata regulatória envolve o sistema de dois componentes NtrB-NtrC, que controla a transcrição do operon NifLA (MERRICK & EDWARDS, 1995). Nas enterobactérias o dímero NtrB é uma histidina quinase citoplasmática que não está ancorada à membrana (RONSON et al., 1987). O sinalizador que modula sua atividade é a proteína PII (GlnB). A ligação de GlnB a NtrB é estimulada quando GlnB está ligada a ATP e 2-oxoglutarato ou glutamato. Em condições suficientes de nitrogênio, GlnB encontra-se na forma desuridililada. Neste caso GlnB interage com NtrB, a qual, então, catalisa a desfosforilação e conseqüentemente a inativação de NtrC. Em condições limitantes de nitrogênio, a ligação de 2-oxoglutarato induz uma mudança conformacional em GlnB, que favorece a uridililação do resíduo de tirosina 51 (de MEL et.al., 1994; KAMBEROV et.al., 1995; ARCONDÉGUY et al., 2001). GlnB na forma uridililada é incapaz de interagir com NtrB. NtrB livre sofre autofosforilação no resíduo de histidina 139, através de uma reação dependente de ATP onde uma subunidade liga o ATP e a outra é fosforilada. NtrB então transfere o grupo fosfato

para NtrC (NINFA et.al.,1993). NtrC fosforilada ativa a transcrição dos genes *glnAntrBC*, dos genes *nifLA* e de outros sistemas alternativos de assimilação de nitrogênio (MERRICK & EDWARDS, 1995).

O segundo nível da cascata envolve a regulação da atividade de NifA em resposta aos níveis de oxigênio pela proteína anti-ativadora NifL e em resposta ao status de nitrogênio intracelular, através de uma interação com uma proteína do tipo PII (GlnK) (SCHMITZ et al., 1997; HE et al., 1998) (Figura 2).

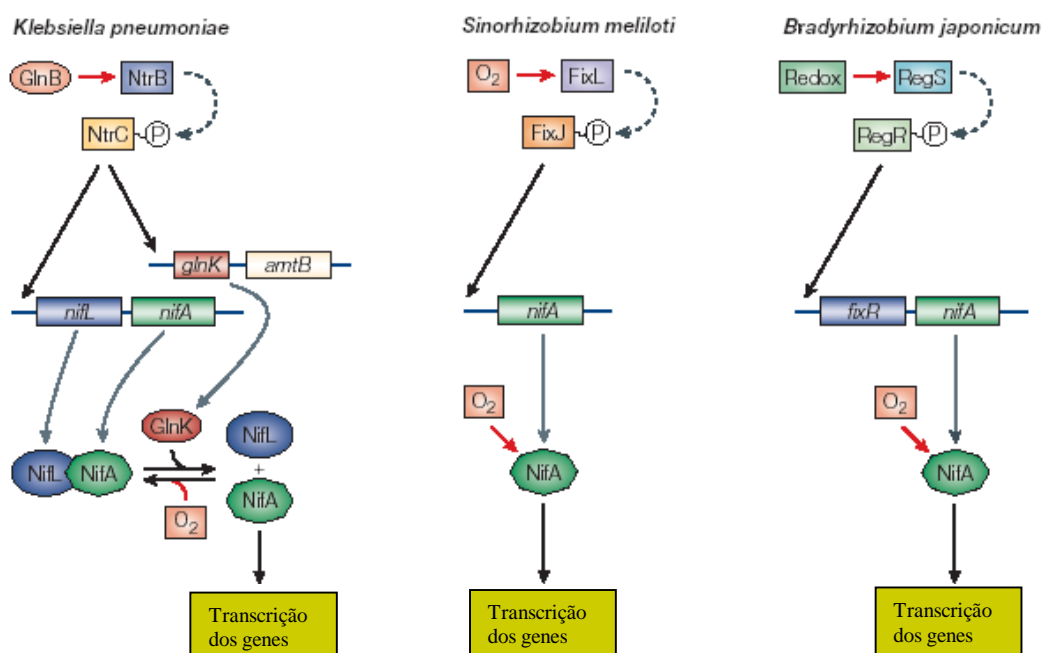


FIGURA 2 - Comparação da cascata regulatória controladora da transcrição dos genes *nif* em diazotrofos de vida livre *K. pneumoniae* e nos diazotrofos simbióticos *S. meliloti* e *B. japonicum*.

\rightarrow Regulação positiva, \rightarrow (vermelho) regulação negativa, $\cdots \rightarrow$ fosforilação, \rightarrow transcrição e tradução. (FONTE: DIXON &KAHN, 2004)

Em *H. seropedicae* o gene *nifA* consiste de uma unidade transcricional independente que codifica para a proteína NifA (SOUZA et al.,1991a). A expressão ocorre a partir de uma região promotora complexa, onde foram encontradas três

prováveis seqüências promotoras do tipo σ^N (-24/-12) (SOUZA et al., 1991b e 2000). À montante da seqüência promotora existem sítios para a ligação dos seguintes elementos regulatórios: 2 sítios para a ligação de NtrC (posições -384 e -349), três sítios para a ligação de NifA (posições -312, -137 e -108) e um sítio para a ligação do fator de integração do hospedeiro IHF (posição -186) (SOUZA et al., 1991b; WASSEM et al., 2000) (FIGURA 3). Os sítios para ligação de NifA são seqüências conservadas conhecidas como UAS (do inglês “upstream activator sequence”) e estão tipicamente presente a montante de promotores dependentes de NifA (MORET & BUCK, 1988).

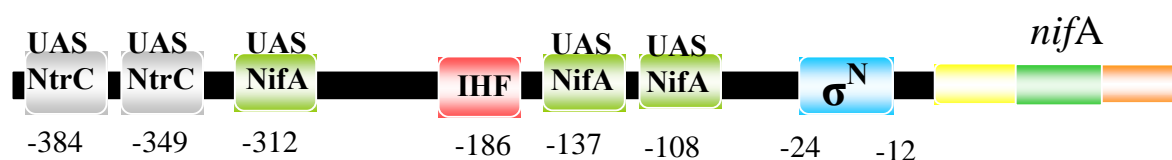


FIGURA 3 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DA REGIAO PROMOTORA DO GENE *nifA* DE *H. seropedicae*. (FONTE: PEDROSA , 2001).

A regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* envolve a proteína NifA e o sistema *ntr* (SOUZA et al., 1991a; SOUZA et al., 1991b). A ativação do promotor *nifA* neste microrganismo é dependente de NtrC e de σ^N , similar ao que ocorre em *K. pneumoniae* (MERRICK & EDWARDS, 1995; WASSEM et al., 2000).

Wassem e colaboradores (2000) mostraram que a ativação do promotor *nifA* pela proteína NtrC *in vitro* é estimulada por IHF, uma proteína que promove o dobramento do DNA (RICE et al., 1996). Em contraste, a ativação do promotor pela NifA é prejudicada por IHF, que previne a auto-ativação contínua do promotor *nifA* pela proteína NifA. Assim, IHF atua positivamente na ativação dependente de NtrC, e negativamente na ativação dependente de NifA do promotor *nifA* de *H. seropedicae* (WASSEM et al., 2000).

Análises da expressão do promotor *nifA* de *H. seropedicae* em *E. coli* e *H. seropedicae* mostraram que a expressão de *nifA* é primariamente dependente de NtrC. Em condições compatíveis com a fixação de nitrogênio (baixas tensões de oxigênio e ausência de amônia) o promotor de *nifA* é inicialmente ativado por NtrC e

o aumento da concentração de NifA estimula sua própria transcrição. Embora a proteína NifA não seja essencial para a expressão de *nifA*, ela é necessária para a expressão máxima. A auto-ativação da expressão de NifA requer a presença do sítio de ligação NifA, localizado 36bp a jusante do sítio para ligação de IHF (FIGURA 3). A deleção do sítio para ligação de IHF produz um promotor com atividade duas vezes maior que o selvagem, sugerindo que o controle da auto-ativação do promotor *nifA* provavelmente é feito por IHF, para evitar potenciais efeitos deletérios decorrentes da super-expressão da proteína NifA sob condições de fixação de nitrogênio (SOUZA et al., 2000; WASSEM et al., 2002).

Diferentemente dos organismos *K. pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii*, membros da subdivisão das γ Proteobactérias, onde o gene *nifA* é co-transcrito com o gene *nifL*, em *H. seropedicae*, assim como em *A. brasilense* e *R. capsulatus* não foi encontrado gene homólogo a *nifL* e NifA parece responder diretamente a amônio e oxigênio (SOUZA et al., 1999; MONTEIRO et al., 1999 a e b; MASEPOHL et al., 1988; ARSENE et al., 1996).

1.4.2 A Proteína NifA

O papel da NifA como ativadora transcricional para expressão dos genes *nif* foi descrito pela primeira vez em *K. pneumoniae* (BUCHANAN-WOLLASTON et al., 1981). Comparações entre seqüências de várias proteínas NifA mostraram que seu tamanho pode variar de 519 a 626 aminoácidos e que consiste de 3 domínios estruturais com variável grau de conservação (FISCHER, 1994). Sua estrutura possui características comuns a muitos ativadores transcricionais que regulam a expressão de genes em conjunto com a RNA polimerase σ^N (MERRICK, 1992).

O domínio C-terminal possui um motivo hélice-volta-hélice altamente conservado e envolvido na ligação ao DNA. A primeira hélice deste motivo possui um significativo grau de conservação com os ativadores dependentes de σ^N e a segunda hélice é específica das proteínas NifA. Este domínio está ligado ao domínio central através de uma região interdomínio (LID) de 32 a 44 resíduos e, no caso das

proteínas NifA de *Rhizobium sp*, *H. seropedicae* e *A. brasilense* apresenta duas cisteínas, que em conjunto com outras duas do domínio central formam um motivo Cys-X₁₁-Cys-X₁₉-Cys-X₄-Cys, o qual constitui um potencial sítio de ligação de metais (FISCHER, 1994; SOUZA et al., 1991b; LIANG et al., 1991).

O domínio central apresenta cerca de 240 aminoácidos e possui um motivo característico de ligação ao ATP, provavelmente envolvido na interação com a subunidade σ^N da RNA polimerase e com a formação do complexo aberto. Este é o domínio catalítico da proteína NifA (LEE et al., 1993).

Entre o domínio central e o N-terminal existe uma região interdomínio, cuja função é manter unidos esses dois domínios funcionais. Essa região interdomínio é geralmente encontrada em proteínas moduladoras de sistemas de transdução e é denominada “Q-linker”, devido ao alto conteúdo de resíduos de glutamina e outros aminoácidos hidrofílicos (FISCHER, 1994).

No domínio N-terminal encontra-se o domínio GAF, que é um modulador de sinal, presente em todos os reinos de vida, que ligam pequenas moléculas tais como nucleotídeos cíclicos monofosfatados e formato (ARAVIND et al., 1997; ANANTHARAMAN et al., 2001). Estes domínios freqüentemente exercem efeitos regulatórios em domínios catalíticos adjacentes, como por exemplo, no controle de fosfodiesterases e ciclases por nucleotídeos 3' 5'- cíclicos (HO et al., 2000; KANACHER et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002) ou no controle da atividade de proteínas ativadoras de transcrição dependentes do fator σ^N da RNA polimerase (STUDHOLME & DIXON, 2003).

Embora o domínio GAF de diferentes proteínas atue na regulação da atividade da NifA, em muitos casos, o mecanismo preciso de regulação ainda não está esclarecido e este domínio parece ter papéis diversos entre os vários diazotrofos. Por exemplo, o domínio GAF da NifA de *Azotobacter vinelandii* liga 2-oxoglutarato, que é um sinalizador do status de carbono, prevenindo desta forma a interação da proteína NifL livre no domínio central (AAA+), sob condições limitantes de nitrogênio. Entretanto a ligação de 2-oxoglutarato no domínio GAF da NifA de *Klebsiella pneumoniae* não foi observado (LITTLE e DIXON et al., 2003). Diferentemente dos domínios GAF das proteínas NifA de outras proteobactérias diazotróficas, em *A. brasilense* a regulação da atividade da NifA via domínio GAF se

dá em resposta a concentração de nitrogênio fixado e da interação com uma proteína transdutora de sinal GlnB (ARSENE et al., 1996; ARSENE et al., 1999; CHEN et al., 2005).

A seqüência de aminoácidos da proteína NifA de *H. seropedicae* apresenta 542 resíduos (SOUZA et al., 1991a). Estudos comparativos mostraram que esta também possui os três domínios estruturais (N-terminal, Central e C-terminal) e as duas regiões interdomínios LID e “Q-linker”, comuns a maioria das proteínas NifA (FISHER, 1994) (Figura 4).

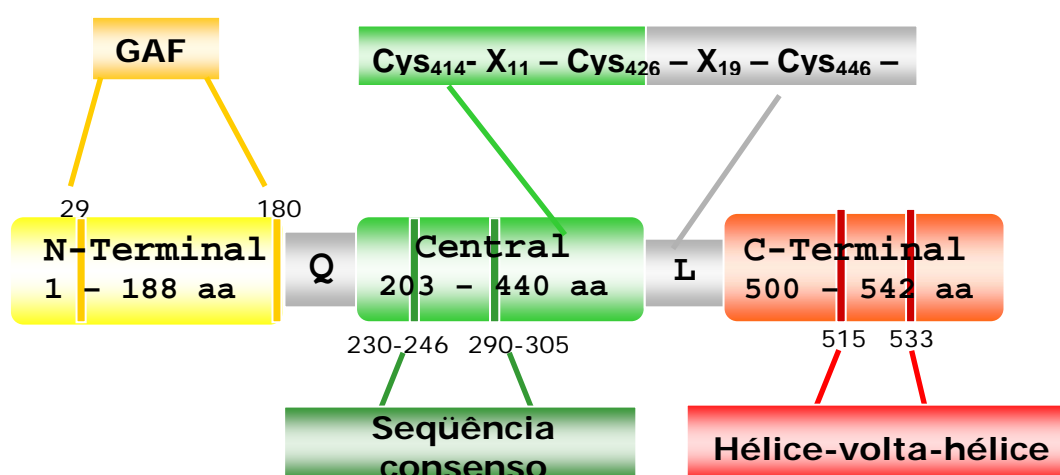


FIGURA 4 – Esquema representando a estrutura da proteína NifA de *H. seropedicae*. Os números que aparecem acima da região N-terminal correspondem a extensão do domínio GAF, os números que aparecem abaixo do domínio Central indicam a localização das seqüências de aminoácidos consenso de ligação de ATP (resíduos 231 a 238 e 294 a 303), os números que aparecem abaixo do domínio C-terminal indicam a localização dos resíduos que formam o motivo hélice-volta-hélice (514 a 533). (FONTE: MONTEIRO, 2001 modificado).

1.4.3 Controle da Atividade da Proteína NifA

A regulação da transcrição dos genes *nif* é mediada inteiramente pela regulação da expressão e controle da atividade da proteína NifA. Os níveis de

amônia, oxigênio e a disponibilidade de elementos metálicos no meio influenciam esse sistema de regulação (MERRICK, 1992).

Nos microrganismos *K. pneumoniae* (BERGER et al., 1995) e *A. vinelandii* (HILL, et. al.,1996), a ativação da transcrição dos genes *nif* pela proteína NifA é controlada pela proteína sensora NifL. A atividade de NifA é inibida por NifL em resposta aos altos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado. Nesses organismos o sensoramento do estado redox é feito via domínio N-terminal da proteína NifL, que contém o fator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (SCHMITZ et al., 1997; HILL et al.,1996). A proteína NifL na sua forma oxidada é capaz de inibir a atividade de NifA, mas quando é convertida na forma reduzida, NifL não atua mais como um anti-ativador (HILL et al.,1996). Ainda em *K. pneumoniae* (HE et al., 1998) e *A. vinelandii* (JACK et al.,1999) NifL também atua como proteína sensora dos níveis de nitrogênio fixado, ao interagir com uma proteína semelhante a PII, denominada GlnK. Em condições de excesso de amônio, a proteína GlnK de *A. vinelandii* está na forma não uridililada, e é capaz de interagir com o domínio C-terminal de NifL, o que aumenta a afinidade de NifL por NifA. Já em baixas concentrações de amônio, a uridililação de GlnK previne sua interação com NifL (LITTLE et al., 2002), no entanto o complexo NifA-NifL só é desfeito na presença de 2-oxoglutarato que liga ao domínio N-terminal de NifA (LITTLE et al., 2000; LITTLE & DIXON et al., 2003; MARTINEZ-ARGUDO et al., 2004). Em *Klebsiella pneumoniae* a proteína GlnK, independente do seu estado de uridililação, é necessária para manter NifL inativa em baixos níveis de nitrogênio (HE et al., 1998). Entretanto, a proteína GlnB pode antagonizar o efeito inibitório de GlnK sobre a atividade de NifL, provavelmente devido a formação de heterotrímeros da proteína GlnK e GlnB, inativando a proteína GlnK (ARCONDEGUY et al., 1999).

Em Proteobacterias diazotróficas que não contêm NifL, a proteína NifA apresenta um motivo Cys-X₄-Cys que está relacionado com a sensibilidade ao oxigênio (FISCHER, 1994). Em *B. japonicum* os resíduos conservados de cisteínas são indispensáveis para a atividade de NifA e íons Fe⁺² são necessários para sua atividade *in vivo* (FISHER et al., 1988).

A proteína NifA de *Azospirillum brasilense*, um diazotrofo pertencente à subdivisão α das Proteobactérias, é sintetizada independentemente dos níveis de oxigênio e de amônio (FADEL-PICHETH et al.,1999). Neste organismo onde

também não foi detectado o gene *nifL*, a atividade da NifA parece ser regulada de acordo com os níveis de amônio, por um mecanismo mediado pela proteína GlnB (ZAMAROCZY et al., 1993; LIANG et al., 1992). Na ausência de amônio, GlnB parece ser necessária para manter a proteína NifA na forma ativa (ARSENE et al., 1996). Já na presença de amônio, o domínio N-terminal da NifA aparentemente inibe sua atividade, provavelmente porque GlnB seja incapaz de manter NifA na forma ativa. Essa sugestão é decorrente de experimentos utilizando a proteína NifA N-truncada (sem o domínio N-terminal) ou com a substituição da tirosina 18 por fenilalanina. Os resultados mostraram que a proteína NifA N-truncada permanece ativa na presença de amônio ou na ausência de PII, indicando que o domínio N-terminal participa da regulação da atividade da NifA por amônio, juntamente com a proteína PII (ARSENE et al., 1996 e 1999).

Diferente de outros diazotrofos, *Rhodobacter capsulatus* que também pertence subdivisão α das Proteobactérias, possui duas cópias funcionais do gene *nifA*, denominados *nifA1* e *nifA2*, que codificam proteínas NifA que diferem somente em 19 ou 22 aminoácidos da extremidade N-terminal (MASEPOHL et al., 1988). Neste organismo o nível de nitrogênio celular é regulado pelo sistema Ntr, similar ao que ocorre em *K. pneumoniae*, onde neste caso, NtrC fosforilada (condição de baixo amônio) ativa a transcrição dos genes *nifA1* e *nifA2*. Ambas proteínas são capazes de ativar a expressão dos genes estruturais da nitrogenase. Portanto, por conter genes homólogos a *glnD*, *glnB*, *glnK*, *ntrB* e *ntrC* e com base na genética e dados bioquímicos, tem sido sugerido para *R. capsulatus*, um mecanismo regulatório similar ao de enterobactérias (MASEPOHL et al., 2002). Embora mutantes *glnB* resultem na expressão de ambas NifA1 e NifA2 na presença de amônio, a expressão dos genes *nif* é parcialmente inibida sob estas condições. A inibição completa no controle pós-traducional da NifA ocorre somente em um duplo mutante GlnB/GlnK, sugerindo que GlnB e GlnK possa substituir uma a outra na repressão da atividade de NifA na presença de amônio (DREPPER et al., 2003). Estudos de interação entre GlnB, GlnK, NifA1 e NifA2 sugerem então que estas proteínas atuem diretamente na regulação das proteínas NifA (PAWLOWSKI et al., 2003). Ao contrário do que acontece com as proteínas NifA de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, nas quais a deleção do domínio N-terminal tornou a proteína NifA ativa e tolerante a amônia, mutantes da NifA1 de *R. capsulatus* que tiveram o domínio N-terminal eliminado total

ou parcialmente, tornaram-se completamente inativos, tanto em *E. coli* quanto em *R. capsulatus* (PASCHEN et al., 2001). Isso indica que o domínio N-terminal é (de alguma forma) essencial para a atividade da NifA neste microrganismo.

O controle da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* tem sido investigado, tanto em sistemas *in vivo* quanto *in vitro* (SOUZA et al., 1999; MONTEIRO et al., 1999a, 1999b e 2001a).

Para estudar as funções dos domínios da proteína NifA de *H. seropedicae* *in vitro* foram construídos plasmídeos que expressavam o domínio Central e C-terminal (forma N-truncada) e apenas o domínio N-terminal. A capacidade de se ligar ao promotor *nifB* de *H. seropedicae* foi demonstrado pela proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* (MONTEIRO et al., 1999a). Esta atividade foi inibida na presença do domínio N-terminal da NifA purificada (MONTEIRO et al., 2001a). A proteína NifA N-truncada também possui atividade de ATPase *in vitro*, que aumentou 2 vezes quando o promotor do gene *nifB* também estava presente. A adição do domínio N-terminal da NifA, também reduziu a atividade ATPásica da NifA N-truncada. Este resultado sugere que o domínio N-terminal interage especificamente com o domínio Central e C-terminal regulando a atividade de ativadora de transcrição de NifA. Ensaio de proteção de proteólise indicaram contato direto entre os domínios Central+C-terminal e o domínio N-terminal da NifA de *H. seropedicae* *in vitro* (MONTEIRO et al., 2001a).

Experimentos *in vivo* para estudar a expressão e regulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* foram realizados em *E. coli*. A proteína NifA selvagem de *H. seropedicae* não é capaz de ativar a expressão da proteína NifH em *E. coli* (SOUZA et al., 1999). Por outro lado, a NifA N-truncada (sem o domínio N-terminal) foi capaz de ativar a transcrição do gene *nifH* de *K. pneumoniae*, mas somente em condição anaeróbica. Este resultado é consistente com a hipótese de que a sensibilidade ao oxigênio não envolve o domínio N-terminal. Recentemente, Monteiro e colaboradores (2003) sugeriram que a sensibilidade da proteína NifA N-truncada ao oxigênio e à indisponibilidade de ferro estão relacionadas e que a proteína Fnr é essencial para a atividade e a estabilidade da proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* em *E. coli*. A proteína Fnr é o regulador transcricional responsável por mudar o metabolismo celular de aeróbio para anaeróbio, podendo

ser um possível transdutor de sinal da disponibilidade de ferro intracelular (GREEN et al., 1996).

Por outro lado, a proteína NifA N-truncada ativa a transcrição do gene *nifH* tanto na presença quanto na ausência de amônio, indicando que o domínio N-terminal (ausente nesta proteína) possa estar envolvido na resposta aos níveis de nitrogênio celular (MONTEIRO et al., 1999a e SOUZA et al., 1999). O controle da atividade de ativador transcricional da proteína NifA N-truncada pela presença de amônio, foi restabelecido quando o domínio N-terminal da NifA foi expresso “in trans” em *E. coli* (MONTEIRO et al., 1999b). Parece que o domínio N-terminal exerce um efeito inibitório sobre os outros domínios da NifA de *H. seropedicae* em resposta a altas concentrações de amônio, atuando de maneira análoga à proteína NifL em *K. pneumoniae* (BERGER et al., 1995) e *A. vinelandii* (HILL et al., 1996). Também em *H. seropedicae* duas proteínas do tipo PII foram identificadas (GlnB e GlnK) e parecem estar envolvidas no processo de sinalização de limitação de nitrogênio para a proteína NifA (BENELLI et al., 1997 e 2001; NOINDORF et al., 2006 e resultados não publicados).

Em vista das evidências de que o domínio N-terminal da proteína NifA de diversos diazotrofos está envolvido na regulação da sua atividade de acordo com os níveis de nitrogênio, tem-se buscado elucidar ao nível molecular esse mecanismo de controle. Estudos cristalográficos da proteína NifA ainda não são conclusivos, devido à difícil solubilização da proteína super-expressa. Entretanto, resultados interessantes obtidos de experimentos de mutagenese e análise do comportamento fisiológico de diferentes mutantes, foram recentemente descritos (ARSENE et al., 1999; PASCHEN et al., 2001).

Em *A. brasilense* uma única mutação na posição 18 do domínio N-terminal da NifA, onde um resíduo de tirosina foi trocado por um de fenilalanina, foi suficiente para permitir o escape do controle de PII mas não do controle de amônio. A partir deste achado, especula-se que o resíduo de tirosina 18 possa ser essencial para interação direta entre NifA e PII, ou que possa ser alvo de modificações covalentes promovidas por uma proteína desconhecida, cuja atividade esteja sob o controle de PII (ARSENE et al., 1999).

Em *R. capsulatus*, tanto uma troca do aminoácido leucina por glutamina na posição 66, como a troca de valina por glutamato na posição 42 do domínio N-

terminal da NifA, resultou em mutantes com atividade de NifA tolerante a amônio. Mutações na região interdomínio ID também resultaram em mutantes com atividade de NifA tolerante a amônio. Esses resultados sugerem que essas mutações possam afetar uma possível interação intramolecular dos domínios N-terminal e C-terminal, levando a tolerância da proteína NifA a amônio (PASCHEN et al., 2001).

A seqüência deduzida de aminoácidos do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e *H. seropedicae* apresentam um alto grau de identidade na região do resíduo de tirosina 18, podendo se indicar mecanismos similares de regulação da atividade da NifA nessas duas bactérias (ARSENE et al., 1999). Desta forma, estudos de mutagênese já descritos na literatura podem orientar estudos semelhantes em *H. seropedicae*.

2 JUSTIFICATIVA

O fato de a proteína NifA ter um papel chave na regulação da fixação biológica de nitrogênio, atuando na regulação da transcrição dos genes *nif* em resposta aos níveis de amônio intracelular, faz desta proteína um importante objeto de estudo. Em *Herbaspirillum seropedicae*, assim como em outras bactérias diazotróficas, esta função está relacionada com o domínio N-terminal da proteína NifA. Estudos desta região baseados em experimentos de mutagênese que alteraram o comportamento fisiológico de diferentes mutantes NifA (ARSENE *et al.*, 1999; PASCHEN *et al.*, 2001) tem contribuído significativamente para a identificação dos aminoácidos envolvidos no processo e para o entendimento do mecanismo de regulação. Desta forma, espera-se que a utilização de abordagem semelhante na investigação da atividade de NifA em *Herbaspirillum seropedicae* possa fornecer elementos que permitam avançar na compreensão do mecanismo da regulação da fixação biológica de nitrogênio neste diazotrofo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo geral estudar o efeito de mutações sítio dirigidas no domínio N-terminal da proteína NifA de *Herbaspirillum seropedicae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter seqüências mutantes do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*, utilizando “primers” mutagênicos ;
- Expressar as proteínas mutadas nos vetores pET28a, pT7-7 e pDK7;
- Determinar o efeito destes domínios N-terminais mutados sobre a atividade proteína NifA-N-truncada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes das bactérias e os plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão listados nas tabelas 1 e 2:

TABELA 1 - BACTÉRIAS

<i>Escherichia coli</i>	Genótipo / Fenótipo	Referência
DH10B	F [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15] <i>pro</i> ⁺ , Sm ^R	GRANT et al., 1990
BL21 (λDE3) pLysS	<i>HsdS</i> , <i>gal</i> (λ <i>clts</i> 857 <i>ind</i> Sam7 <i>nin5</i> <i>lacUV5</i> -T7 gene 1) (produtora da RNA polimerase do fago T7).	SAMBROOK et al., 1989
JM109 (DE3)	<i>RecA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F' [<i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> ΔM15] NaI ^R (produtora da RNA polimerase do fago T7)	SAMBROOK et al., 1989
7118	Δ (<i>lac-pro</i>) F' <i>lacI</i> ^q Z M15 <i>pro</i> ⁺	MESSING et al. 1977

^R confere resistência ao referido antibiótico

TABELA 2: PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Principais Características	Referência
pGEM-T	Vetor de clonagem de produtos de PCR, Amp ^R	PROMEGA Inc.
pET28a	Vetor de expressão/promotor T7 /com fusão His-tag , Km ^R	NOVAGEN
pT7-7	Vetor de expressão/promotor T7, Amp ^R	BIOLABS
pDK7	Vetor de expressão/ promotor <i>tac</i> , Cm ^R	KLEINER et al., 1988
pEMS130	Gene <i>nifA</i> de <i>H.seropedicae</i> subclonado no vetor pTZ18-R, Amp ^R	SOUZA et al. (1991b)
pRT22	Contém a fusão <i>nifH::lacZ</i> de <i>K. pneumoniae</i> , Cm ^R	TULI & MERRICK, et al., 1988
pRAM2T7	DNA referente ao domínio Central+C-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pT7-7, Amp ^R	MONTEIRO,2001
pLET Y18F	pGEM-T::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da tirosina 18 por fenilalanina	Este trabalho
pLET L52Q	pGEM-T::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da leucina 52 por glutamina	Este trabalho
pLET V138E	pGEM-T::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da valina 138 por ácido glutâmico	Este trabalho
pLET 2	pGEM-T::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> , com mutação da valina 138 por ácido glutâmico e do ácido glutâmico 134 por valina	Este trabalho
pLET 4	pGEM-T::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina, da valina 138 por ácido glutâmico e da arginina 157 por histidina	Este trabalho
pETLET	pET28a::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i>	ETTO, 2003
pETLET Y18F	pET28a::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da tirosina 18 por fenilalanina	Este trabalho
pETLET L52Q	pET28a::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da leucina 52 por glutamina	Este trabalho
pETLET V138E	pET28a::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da valina 138 por ácido glutâmico	Este trabalho
pETLET 2	pET28a::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da valina 138 por ácido glutâmico e do ácido glutâmico 134 por valina	Este trabalho
pETLET4	pET28a::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina, da valina 138 por ácido glutâmico e da arginina 157 por histidina	Este trabalho
pT7LET	pT7-7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
pT7LET Y18F	pT7-7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da tirosina 18 por fenilalanina	Este trabalho
pT7-7LET L52Q	pT7-7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da leucina 52 por glutamina	Este trabalho
pT7LET V138E	pT7-7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da valina 138 por ácido glutâmico	Este trabalho
pT7LET 2	pT7-7:: DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com as mutações da valina 138 por ácido glutâmico e do ácido glutâmico 134 por valina	Este trabalho

pT7LET 4	pT7-7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com as mutações da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina, da valina 138 por ácido glutâmico e da arginina 157 por histidina	Este trabalho
pDKLET	pDK7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho
pDKLET Y18F	pDK7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da tirosina 18 por fenilalanina	Este trabalho
pDKLET L52Q	pDK7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da leucina 52 por glutamina	Este trabalho
pDKLET V138E	pDK7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da valina 138 por ácido glutâmico	Este trabalho
pDKLET 2	pDK7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da valina 138 por ácido glutâmico e do ácido glutâmico 134 por valina	Este trabalho
pDKLET 4	pDK7::DNA referente ao domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> com mutação da isoleucina 96 por valina, do ácido glutâmico 134 por valina, da valina 138 por ácido glutâmico e da arginina 157 por histidina	Este trabalho

4.2 REAGENTES

Antibióticos, enzimas, reagentes, marcadores de tamanho molecular de DNA e massa molecular de proteínas foram obtidos da Sigma Chemical Company, Merck Chemical Company, Fermentas, Applied Biosystem, Amersham Biosciences, Invitrogen Inc., British Drug House (BDH) e New England Biolabs.

4.3 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas nos meios líquidos LB, Terrific Broth, SOB, SOC (SAMBROOK et. al., 1989) ou NFDM (meio mínimo Nitrogen-Free Derepression Medium) (CANNON et al., 1976) sob agitação (130 rpm); ou em meio sólido LA. Em todos os casos a temperatura de incubação foi de 37°C. Para a superexpressão das proteínas a temperatura de incubação foi de 30°C.

- O meio Terrific Broth foi utilizado para cultivar células visando uma posterior extração de seus plasmídeos por lise alcalina (item 4.6) e apresenta a seguinte composição:

	Gramas/litro
Extrato de levedura	24,0
Triptona	12,0
KH ₂ PO ₄	2,31
K ₂ HPO ₄	12,54
Glicerol	4,0 mL/L

- O meio LB foi utilizado como pré-inoculos dos ensaios de β -galactosidase (item 4.12.1) e para superexpressar proteínas (item 4.11), apresenta a seguinte composição:

	Gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O pH foi corrigido para 7,0 com solução de NaOH 1 mol/L.

O meio sólido LA foi preparado pela adição de 15 g/L de ágar ao meio líquido LB e foi utilizado para a obtenção de colônias isoladas de *E. coli*. Quando estas estirpes continham o vetor pGEM-T inserido, foram adicionados a este meio 20 μ L de uma solução estoque de 30mg/mL de X-Gal (Sambrook et al., 1989).

- O meio SOB foi utilizado para o preparo de células eletrocompetentes de *E. coli* (item 4.9.1) e apresenta a seguinte composição :

	Gramas/litro
Triptona	20,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	0,6
Cloreto de potássio	0,19
Cloreto de magnésio	0,2

O pH foi corrigido para 7,0 com solução de NaOH 1 mol/L.

- O meio SOC foi utilizado para a recuperação das células de *E.coli* após a eletroporação (item 4.9.2) e apresenta a seguinte composição:

	Gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Triptona	20,0
Cloreto de sódio	0,6
Cloreto de potássio	0,19
Cloreto de magnésio	0,2
Sulfato de magnésio	1,20
Glucose	3,60

- O meio NFDM foi utilizado para os ensaios de β -galactosidase (item 4.12.1) e apresenta a seguinte composição :

	Gramas/litro
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
MgSO_4	0,1
KH_2PO_4	3,4
K_2HPO_4	12,06
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025
Glucose	20,0

Todos os meios foram esterilizados por autoclavação a 1atm por 20 minutos.

4.4 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados durante os cultivos e as suas respectivas concentrações finais estão listados na tabela 3.

TABELA 3 – LISTA DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS CULTIVOS DE BACTÉRIAS

Antibióticos	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	250	250
Canamicina (Km)	50	100
Estreptomicina (Sm)	80	80
Ácido Nalidíxico (Nal)	10	10
Cloranfenicol (Cm)	30	30

As soluções estoques dos antibióticos foram preparadas segundo SAMBROOK et al (1989).

4.5. MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DA REGIÃO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA

Para a amplificação da região correspondente ao domínio N-terminal da proteína NifA contendo as mutações sítio-dirigidas, foi necessário a síntese de oligonucleotídeos específicos (“primers”). Os “primers” HsnifA1, HsnifA3A foram sintetizados no laboratório de Fixação de Nitrogênio da UFPR, os “primers” UNIVERSAL, REVERSO e os “primers” mutagênicos MUTY18F, MUTV40E, MUTL52Q e MUTV138E-U foram produzidos pela Invitrogen Inc. As características de cada “primer” e as suas seqüências de nucleotídeos estão na tabela 4.

Sítios de restrição para diferentes enzimas foram introduzidos nos “primers” e permitiram a clonagem posterior destes fragmentos de DNA.

Para todas as reações de mutagênese sítio-dirigida foi utilizado como molde o plasmídeo pEMS130 (TABELA 2), os “primers” HsnifA1, HsnifA3A (gentilmente cedidos pela professora Leda) e um dos seis primers mutagênicos (TABELA 4).

As reações de amplificação foram realizadas como descrito por MONTEIRO, 2001 ou LING & ROBINSON, 1997 em termociclador Mastercycler Gradient

(Eppendorf AG), ciclos: 94°C 2 minutos uma vez; 94°C 1minuto, 50°C 1.5minutos e 72°C 3minutos vinte e cinco vezes; e 94°C 45 segundos, 50°C 1minuto e 72°C 5 minutos uma vez. Os fragmentos de DNA resultantes destas reações foram purificados em eletroforese em gel de baixo ponto de fusão (item 4.10.2) e posteriormente clonados no vetor pGEM-T (TABELA 2) (item 4.7.1).

4.6 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS EM PEQUENA ESCALA

A extração de plasmídeos foi feita segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). Três mililitros de cultura bacteriana cultivada durante um período de 10 a 12 horas sob agitação foram centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. O sedimento de células foi ressuspensão em 100µL de GET (glucose 50 mmol/L, Tris.HCl 25 mmol/L pH 8.0 e EDTA 10 mmol/L) e as células foram lisadas pela adição de 200µL de Solução de Lise (SDS 1% e NaOH 0,2 mol/L). DNA cromossomal, proteínas e fragmentos celulares foram precipitados com a adição de 180µL de Kcaf (acetato de potássio 3mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8mol/L) e incubação por 10 minutos no gelo. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e tratado com um volume da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA plasmidial foi precipitado com a adição de 3 volumes de etanol 96%, a mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e depois centrifugada a 13.000 rpm por 20 minutos. O precipitado foi lavado com 1mL de etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 30 µL de água ultrapura.

TABELA 4: Oligonucleotídeos empregados para mutagenizar o domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*.

Primers	Característica	Seqüência de nucleotídeo
HsnifA1	alinha com a extremidade 5' da seqüência do domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> , inserindo sítios de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Nde</i> I	5' TAGGGATCCCATATGGCCACT 3'
HsnifA3A	alinha com a extremidade 3' da seqüência do domínio N-terminal da NifA de <i>H. seropedicae</i> , inserindo sítio de restrição <i>Bam</i> HI	5' CTCGATAACTGAGGATCCAT 3'
UNIVERSAL	alinha com o vetor pGEM-T na posição 2941-2957	5' GACGTTGTAAAACGACGGCC 3'
REVERSO	alinha com o vetor pGEM-T na posição 161-177	5' TTTCACACAG GAAACAGCTATGAC 3'
MUTY18F-U	alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 3', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido tirosina por fenilalanina na posição 18 da proteína	5' TTAGAGCTCGTAACGATTTTCGAGATC 3'
MUTY18F-R	alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 5', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido tirosina por fenilalanina na posição 18 da proteína	5'GATCTCGAAAATCGTTACGAGCTCTAA 3'
MUTV40E-R	alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 5', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido valina por glutamato na posição 40 da proteína	5'GGCGGAGAGCTCGTTGAGG 3'
MUTL52Q-U	alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 3', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido leucina por glutamina na posição 52 da proteína	5' CGGGTATTGCAAGAGTCTGATGCAGG3'
MUTL52Q-R	alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 5', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido leucina por glutamina na posição 52 da proteína	5' CCTGCATCAGACTCTGCAATACCCG 3'
MUTV138E-U	alinha com a seqüência do domínio N-terminal de <i>H. seropedicae</i> no sentido 5', inserindo um códon mutagênico que permite a troca do aminoácido valina por glutamato na posição 138 da proteína	5' AATGCTGGGTGAGTTGTGCG 3'

Azul: sítio de restrição para a endonuclease *Bam*HI

Vermelho: sítio de restrição para a endonuclease *Nde*I

Verde: sítio de restrição para a endonuclease *Sac*I

Laranja: nucleotídeo alterado

4.7 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA A VETORES

4.7.1 Clonagem no vetor pGEM-T

O vetor pGEM-T foi usado para clonar produtos amplificados por PCR. Esse sistema se favorece da adição de uma adenina nas extremidades 3' dos fragmentos de DNAs amplificados pela *Taq* polimerase I, que durante a etapa de ligação é capaz de formar pontes de hidrogênio com a timina presente nas extremidades 3' do vetor pGEM-T linearizado, situado no interior do gene da β -Galactosidase (*lacZ*). O sistema de ligação continha 0,3 μ L (15ng) do vetor linearizado, 5 μ L (100ng) do produto de amplificação, tampão de ligação 1x (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,6; MgCl₂ 10mmol/L; DTT 1mmol/L; ATP 0,5mmol/L; e PEG 8000 5%) e 1U de T4 DNA ligase num volume final de 15 μ L. O sistema foi incubado a 18°C por 12h. Posteriormente 1 μ L do sistema de ligação foi usado para transformação bacteriana (item 4.9.2).

4.7.2 Clonagem em vetores de expressão

Os fragmentos de DNA correspondentes ao domínio N-terminal da proteína NifA mutantes e os vetores de expressão pET28a, pT7-7 e pDK7 foram digeridos com enzimas de restrição apropriadas, seguindo procedimento recomendado pelo fabricante (Invitrogen, Fermentas ou Amersham Biosciences).

A desfosfatização dos vetores já previamente clivados com enzimas de restrição foram realizadas utilizando-se 1 unidade da fosfatase alcalina de camarão (SAP)(Amersham Biosciences) em um sistema de 20 μ L e o tampão específico para a enzima SAP. A mistura foi incubada por 1 hora e meia a 37°C e a fosfatase alcalina foi posteriormente inativada por aquecimento a 65°C por 15 minutos.

Os fragmentos de DNAs clonados no vetor pGEM-T e os vetores pET-28a, pT7-7 e pDK7 (TABELA 2) já previamente digeridos com enzimas de restrição apropriadas e desfosfatizados foram ligados numa proporção de 5:1

(fragmento:vetor), na presença de tampão T4 DNA ligase 1x (Invitrogen) e 0,5U da enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 18°C durante 12h. Em seguida, 1µL do sistema de ligação foi usado para transformação bacteriana (item 4.9.2).

4.8 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os plasmídeos resultantes da clonagem dos domínios N-terminais mutantes de *H. seropedicae* no vetor pGEM-T (item 4.7.1) foram seqüenciados com os primers universal e reverso (TABELA 3) para averiguação da integridade da seqüência.

A reação de seqüenciamento baseou-se no método de Sanger (SANGER et al., 1977), onde dideoxinucleotídeos são utilizados como terminadores de cadeia. Utilizou-se um Sequenciador Automático de DNA (Perkin-Elmer) modelo 377 que detecta quatro cromóforos fluorescentes como terminadores de cadeia.

4.8.1.Preparo do Material para Seqüenciamento

A extração dos plasmídeos foi realizada de acordo com item 4.6. À solução de plasmídeos obtida adicionou-se 0,5µL de RNase (5mg/mL) e a mistura foi incubada a 37° C por 2 horas. Terminado o tempo, foi efetuada mais uma extração com 100 mL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Em seguida o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto por 30 minutos no gelo, centrifugado, e o precipitado lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 8 µL de H₂O ultrapura.

4.8.2.Reação de Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento continha de 100 a 500ng do DNA purificado, 4µL de mistura para seqüenciamento (tampão com Terminator Ready Rxn Mix e

DNA polimerase), 10 pmol do “primer” reverso ou universal e H₂O estéril para o volume final de 10 µL. A solução foi submetida a uma reação de amplificação com o seguinte programa: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de 20 segundos a 96°C e 1 minuto e 30 segundos a 60°C.

O produto da reação de seqüenciamento foi transferido para um tubo plástico de 500µL, sendo então acrescentados 10µL de água e 20µL de isopropanol. Essa mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Após centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm, o precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 15 µL de tampão Blue Dextran/EDTA diluído 5:1 em formamida deionizada, pH 8. O material foi analisado em Seqüenciador Automático de DNA.

4.8.3 Análise da Seqüência de DNA

As seqüências de nucleotídeos obtidas após o seqüenciamento, foram analisados utilizando os programas BLAST (GeneBank/NCBI) (ALTSCHUL et al., 1997), Clustal W (THOMPSON et al., 1997) e o BioEdit (HALL, 1999).

4.9. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

4.9.1. Preparo de Células Eletrocompetentes

Duzentos e cinquenta mililitros de meio SOB (item 4.3) foram inoculados com 2,0 mL de uma cultura saturada de *E. coli* e incubados a 37 °C sob agitação até atingir uma A_{600nm} entre 0,5 e 0,8. A cultura foi resfriada em banho de gelo por 20 minutos. As células foram coletadas por centrifugação a 2500g por 5 minutos e lavadas duas vezes com 80mL de água ultrapura gelado e uma vez com 40mL de glicerol 15% gelado. O sedimento de células foi ressuspensão em 150µL de glicerol 15% e o volume dividido em alíquotas de 20µL conservadas a - 70°C.

4.9.2 Transformação Bacteriana

Para transformação bacteriana, 1 μ L da mistura da ligação vetor/DNA inserto foi adicionado a 20 μ L da suspensão de células eletrocompetentes e incubado no gelo por 1 minuto. Essas células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação e submetidas a um campo elétrico (4K Ω , 330 μ F). Após a eletroporação as células foram inoculadas em 1mL de meio SOC (item 4.3) e incubadas a 37° C, sob agitação por 1 hora. Ao término da incubação, alíquotas da suspensão foram semeadas em placas de Petri contendo meio LA (item 4.3) com o(s) antibiótico(s) adequado(s) a 37°C.

4.9.3 Estocagem das *E. coli* Transformadas com os Vetores deste Trabalho

As estirpes de *E. coli* DH10B contendo os plasmídeos construídos neste trabalho foram cultivadas em meio Terrific Broth (item 4.3) até $A_{600nm} = 2,0$. Um mililitro desta cultura foi centrifugado a 13000 rpm e ressuspensa em 600 μ L de glicerol 50% e posteriormente foram mantidas a – 20 °C.

4.10. SEPARAÇÃO DE MOLÉCULAS POR ELETROFORESE

4.10.1 Eletroforese de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em géis de agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK et al. (1989). Os géis de agarose foram preparados em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3), em uma concentração de 0,8% (m/v) e foram utilizados para a verificação da eficácia

dos sistemas de restrição (item 4.7.2).

O DNA foi visualizado em um transluminador de luz ultravioleta, após tratamento do gel com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e o perfil eletroforético foi registrado em um sistema de vídeo-documentação (UVP – GDS 5000).

4.10.2 Purificação de DNA através de Eletroforese em Gel de Baixo Ponto de Fusão

O DNA produzido por restrição (item 4.7.2), foi submetido a uma eletroforese, utilizando gel de agarose de baixo ponto de fusão 0.8% (“Low Melting Point” – LMP) e tampão TAE 1X(Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3). Após a coloração do gel com azul de metileno 0,25%, cortou-se a banda de DNA desejada, transferindo-a para um tubo plástico de 1,5mL. Aqueceu-se a 65 °C para que ocorresse a fusão do gel e se adicionou ao sistema: tampão Tris-HCl 1mol/L pH 8,0 suficiente para alcançar a concentração de 100mM, EDTA 0,5mol/L para concentração de 1mM, NaCl 5mol/L para concentração de 250mM e 1 volume (em relação ao volume de gel fundido) de fenol equilibrado pH 8,0. Homogeneizou-se vigorosamente e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 10 minutos. A fase aquosa foi coletada e a esta adicionou-se 1 volume de isopropanol. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 10 minutos, desprezando depois o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1mL de etanol 80%, centrifugando depois a 13.000 rpm por 5 minutos. Após secagem, o precipitado resultante foi dissolvido em 10 µL de H₂O ultrapura.

4.10.3 Eletroforese de Proteína (SDS-PAGE)

As proteínas foram analisadas por eletroforese em géis de poli(acrilamida) sob condições desnaturantes, conforme o descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel utilizada foi de 15%, uma vez que as proteínas analisadas tinham massa

molecular acima de 20kDa (N-terminal e N-truncada da proteína NifA de *H. seropedicae*). Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Blue e foram analisados por densitometria utilizando o programa LabWorks (BIOIMAGING SYSTEMS).

4.11. EXPRESSÃO DAS FORMAS NATIVAS E MUTANTES DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS DA PROTEÍNA NIFA DE *H. seropedicae*.

Dez mililitros de meio LB (item 4.3) foram inoculados com 100 μ L de uma cultura saturada de *E. coli* contendo os plasmídeos de expressão construídos neste trabalho (TABELA 2) e incubados sob agitação a 37°C. Quando a cultura atingiu A_{600nm} de aproximadamente 0,5, foi adicionado IPTG 1mol/L para uma concentração final de 0,5mmol/L e incubou-se a 30°C por 3 horas. Após esse período as células foram coletadas por centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sedimento de células foi ressuspenso em 500 μ L de Solução de Sonicação (500mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 1mmol/L ditioneitol e 10% glicerol e 20 mg/mL de lisozima). Depois de ressuspensas as células foram lisadas por sonicação em 3 ciclos de 20 segundos no Sonicador Heat System. Durante toda a etapa de lise as células foram mantidas em gelo. A mistura lisada foi separada em fração solúvel e insolúvel por centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. As proteínas foram analisadas por eletroforese de poliacrilamida em condição desnaturante (item 4.10.3).

4.12 ANÁLISE FISIOLÓGICA DAS FORMAS MUTADAS DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS DA PROTEINA NIFA DE *H. seropedicae*

4.12.1 Adequação das Condições Fisiológicas de Cultivo

Os plasmídeos obtidos neste trabalho e o plasmídeo pRAM2T7 (TABELA 2) foram inseridos nas estirpes de *E. coli* JM109(DE3) (TABELA 1), que não apresenta atividade de β -galactosidase. Esta bactéria ainda continha o plasmídeo repórter pRT22 contendo a fusão *nifH::lacZ* (TABELA 2). As células foram cultivadas em meio LB (item 4.3) durante a noite a 37⁰ C com os antibióticos adequados. Pré-inóculos foram cultivados em meio NFDM (item 4.3) contendo fosfato 1X, NH₄Cl 20mmol/L, meio LB 5%, glicose 2% durante 12h a 37⁰ C e os antibióticos adequados. As culturas foram centrifugadas por 3 min a 5000 rpm e as células ressuspensas em meio NFDM visando a retirada do NH₄Cl residual. As células foram então diluídas a uma A_{600nm} próxima a 0,2 em um volume final de 4 mL de NFDM, acrescido de tiamina 5 μ g/mL e IPTG 0,5mmol/L para a indução das proteínas de interesse. Duplicatas destas culturas foram diluídas a uma A_{600nm} próxima a 0,2 para um volume final de 4 mL de NFDM sem a adição de NH₄Cl 20mmol/L. Em seguida o oxigênio das culturas foi trocado por gás argônio durante 15 minutos, visando obter um ambiente anaeróbico. A partir de então as culturas foram incubadas durante 8h a 30⁰ C.

4.12.2 Determinação da Atividade de β -galactosidase

Essa determinação foi feita segundo MILLER (1992). Após a incubação, 100 μ L da cultura de células foram lisadas com 25 μ L de clorofórmio e agitados em vórtex durante 10 segundos. Em seguida foram adicionados 900 μ L de tampão Z (Na₂HPO₄ 60 mmol/L, NaH₂PO₄ 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO₄ 1 mmol/L, β -

mercaptoetanol 50 mmol/L e SDS 0,1%). Após uma rápida homogeneização a mistura de reação foi incubada a 30⁰ C durante 10 minutos. A reação foi então iniciada pela adição de 200μL de solução de o-nitrofenil β-D-galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/ml e incubados em Banho Maria a 30⁰ C. Depois de exatos 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 500μL de Na₂CO₃ 1mol/L. Em seguida foram realizadas as leituras de absorbancia a 420nm (o-nitrofenol), 550nm (interferência da mistura) e 600nm (densidade celular).

Os cálculos de atividade foram feitos a partir da fórmula abaixo:

$$\text{Atividade de } \beta\text{-galactosidase} = \frac{1000 \times (A_{420\text{nm}} - 1,75 \times A_{550\text{nm}})}{t \times V \times A_{600\text{nm}}}$$

t = tempo de incubação em minutos

V = volume da cultura de células em mL

A nm = Absorbância no comprimento de onda indicado

A atividade de β-galactosidase foi expressa em unidades Miller. Todas as determinações foram feitas em duplicatas e para a confirmação dos resultados as proteínas presentes em cada sistema foram submetidas a confirmação em gel de SDS-PAGE (item 4.10.3) e Immunoblotting (item 4.14.3).

4.13 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Esse método é baseado na ligação do Coomassie Blue G-250 com a proteína (BRADFORD, 1976). O sistema de reação continha 900μL de solução de Bradford (100mg/L Coomassie Brilliant Blue G250, 95% etanol, 85% ácido fosfórico) e 100μL de amostra. Essa mistura foi homogeneizada e a absorbância determinada a 595nm. A curva padrão foi feita utilizando albumina soro bovino (BSA) como referência.

4.14 DETECÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO ANTICORPOS POLICLONAIS

Esta técnica se baseia da habilidade dos anticorpos reconhecerem e se ligarem a antígenos determinados, aproveitando-se da função fisiológica de defesa imunológica humoral dos anticorpos, quando estes são produzidos no soro de animais.

4.14.1 Obtenção de Anticorpos Policlonais (anti-N-terminal e N-truncada)

Os anticorpos policlonais anti-N-terminal e anti-N-truncada foram obtidos por Monteiro (2001), através da imunização de coelhos com a utilização de 500 µg das proteínas correspondentes em adjuvante de Freund incompleto em intervalos de 3 semanas. Cinco dias após a terceira imunização, 20 mL do sangue do coelho foi coletado, o soro contendo os anticorpos foi separado e armazenado a -20°C .

4.14.2 Remoção de Anticorpos Inespecíficos do Soro

Uma cultura de 100 mL saturada de células de *E. coli* estirpe BL21 (DE3) pLysS, foi centrifugada por 5 minutos a 10000 rpm e o extrato de células foi ressuspensão em tampão TBS. Após esse procedimento as células ressuspensas foram sonificadas em Sonicador Heat System em 3 ciclos de 20 segundos. Esse extrato foi adsorvido em uma membrana de nitrocelulose por 12 horas, após esse período a membrana foi lavada 3x em tampão TBS por cinco minutos, sendo ao final incubada com os anticorpos específicos diluídos 1/5000 em TBS com 5% de leite desnatado Molico, pelo período de 2h. Após esse tratamento esta solução com os anticorpos foi utilizada nos ensaios de “immunoblotting”.

4.14.3 “IMMUNOBLOTTING”

O procedimento utilizado foi o descrito por Burnete (1981).

As culturas de células utilizadas nos ensaios de β -galactosidase foram aplicadas em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (item 4.10.3). Após a corrida, o gel foi equilibrado em tampão de transferência (16 mmol/L Tris, 30,7 mmol/L glicina, 0,1% SDS, 20% metanol) por 10 minutos e utilizado para a transferência das proteínas para uma membrana. O aparato para a transferência (BioRad) foi montado e o gel foi colocado em contato com uma membrana. A transferência foi realizada por uma hora a 150 mA. A seguir a membrana foi incubada por duas horas a temperatura ambiente em tampão TBS (50 mmol/L Tris-HCL pH 8,0, 150 mmol/L NaCl, 0,002% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado, a fim de bloquear a membrana. Transcorrido esse período, foi adicionado o anticorpo em uma diluição de 1/5000 (MONTEIRO, 2001) e o sistema foi incubado durante toda a noite, sob leve agitação. Após esse período, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS por cinco minutos. Em seguida foi adicionado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (HRP) diluído 1/5000 em TBS contendo 5% de leite desnatado, seguido de incubação durante duas horas sob agitação suave. Após esse período a membrana foi lavada novamente três vezes em tampão TBS durante 5 minutos. Terminada a lavagem, iniciou-se então a revelação por quimioluminescência, utilizando o kit ECL Western Blotting detection reagents (Amersham Biosciences) segundo procedimento recomendado pelo fabricante. A revelação foi realizada em um sistema de vídeo-documentação (UVP – GDS 5000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de fixação de nitrogênio é altamente dispendioso do ponto de vista energético, uma vez que, para a redução de 1 mol de N_2 a 2 mols de NH_3 são gastos aproximadamente 16 mols de ATP (POSTGATE, 1998). Embora os diversos organismos diazotróficos apresentem diferentes vias regulatórias da fixação biológica de nitrogênio, em pelo menos uma etapa destas cascatas haverá a regulação da expressão ou a modulação da atividade da proteína NifA. Este evento é uma resposta da célula aos níveis de oxigênio e/ou nitrogênio e faz desta proteína um elemento chave na regulação da fixação de nitrogênio (FISHER, 1994; DIXON, 2004).

A estrutura da proteína NifA compreende três domínios característicos: o domínio C-terminal que possui um motivo hélice-volta-hélice altamente conservado envolvido na ligação ao DNA; o domínio central que possui um motivo característico de ligação ao ATP, provavelmente envolvido na interação com a subunidade σ^N da RNA polimerase e com a formação do complexo aberto (LEE et al., 1993; BERGER et al., 1995) e o domínio N-terminal que apresenta o menor grau de conservação da seqüência de aminoácidos entre as proteínas NifA (FISCHER, 1994). É nesta região da proteína que se encontra o domínio GAF (HO et al., 2000), um provável regulador da atividade de diferentes proteínas NifA. Em muitos casos, o mecanismo preciso de regulação ainda não está claro, mas há indícios que nos diazotrofos *Azospirillum brasilense*, *Rhodobacter capsulatus* e *Herbaspirillum seropedicae*, este domínio seja o responsável pela regulação por amônio (ARSÈNE et al., 1996; MONTEIRO et al., 1999b; SOUZA et al., 1999; PASCHEN et al., 2001).

Estudos realizados com a proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* demonstraram que esta proteína ativa a expressão da fusão *nifH::lacZ* na presença de íons amônio (MONTEIRO et al., 1999a; SOUZA et al., 1999). A regulação por íons amônio é retomada, em *E. coli*, quando a proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* é complementada *in trans* com seu domínio N-terminal (MONTEIRO et al., 1999b).

Em *A. brasilense*, a regulação da atividade de NifA depende da presença da proteína GlnB, uma vez que em mutantes *glnB*, NifA é traduzida mas é inativa (LIANG

et al., 1992). Experimentos realizados em *E. coli* com proteínas GlnB e NifA de *A. brasilense*, também indicaram necessidade de GlnB para a atividade de NifA (Araújo et al., 2004). Na presença de amônio, o domínio N-terminal inibe a atividade proteínica, provavelmente porque nestas condições, a proteína GlnB é incapaz de manter NifA na forma ativa. Entretanto, esta proteína sem domínio N-terminal manteve-se ativa na presença de amônio ou na ausência de GlnB (ARSENE et al., 1996). Constatou-se ainda que a mutação de um resíduo de tirosina na posição 18 do domínio N-terminal, foi suficiente para produzir uma proteína NifA ativa que não necessita de GlnB para sua ativação sob condições de fixação de nitrogênio (ARSENE et al., 1999).

Ao contrário do observado para a proteína N-truncada de *A. brasilense* e *H. seropedicae*, em que deleções do domínio N-terminal produziram uma proteína NifA ativa e tolerante a amônio (ARSENE et al., 1996; MONTEIRO et al., 1999a), em *R. capsulatus* deleções nesta região inativaram completamente a proteína NifA1, indicando que este domínio é essencial para a atividade desta proteína tanto em *R. capsulatus*, quanto em *E. coli* (PASCHEN et al., 2001). Ao analisarem a atividade destas proteínas NifA1 contendo mutações randômicas no domínio N-terminal, Paschen e colaboradores (2001), notaram que a troca do resíduo de leucina na posição 66 por glutamina e da valina na posição 42 por glutamato, foi suficiente para produzir uma proteína NifA1 tolerante a amônio. Os mesmos autores observaram que a troca da lisina 531 por treonina no domínio C-terminal produzia uma proteína incapaz de ativar a expressão da fusão cromossomal *nifH::lacZ*. Diante destas observações, os autores concluíram que a mutação do domínio N-terminal, em *R. capsulatus*, confere tolerância a íons amônio e que há uma provável interação intra- ou inter-molecular entre o domínio N-terminal e o domínio de ligação do DNA da proteína NifA1.

Apesar do baixo grau de identidade (14,2%) entre as seqüências de aminoácidos dos domínios N-terminais *A. brasilense*, *H. seropedicae* e *R. capsulatus* (FIGURA 5), o resíduo de tirosina na posição 18 (ARSENE et al., 1999) apresentou-se conservado na seqüência de aminoácidos do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*. Arsene e colaboradores (1999) ressaltaram a existência de um alto grau de identidade na região do resíduo de tirosina 18 em *A. brasilense* e *H. seropedicae* e sugeriram a existência de mecanismos regulatórios similares da atividade da proteína NifA nestes

dois microrganismos. O mesmo grau de conservação pode ser observado nas proteínas NifA1 e NifA2 de *R. capsulatus* (figura 5) e isto reforça a importância do resíduo Tyr18 na atividade regulatória deste domínio, uma vez que aminoácidos envolvidos em interações intra ou intermoleculares apresentam-se conservados entre diferentes espécies. Os aminoácidos leucina na posição 66 e a valina na posição 42 de *R. capsulatus* (PASCHEN et al., 2001) serviram de referência para a mutações sítio dirigidas da valina na posição 40 e da leucina na posição 52 de *H. seropedicae*.

Por não apresentarem o sistema NifL-NifA em que NifL controla a atividade de NifA em resposta aos níveis nitrogênio, como observado em *Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii* (HE et al., 1998; JACK et al., 1999; LITTLE & DIXON, 2003; MARTINEZ–ARGUDO et al., 2004) e considerando-se as evidências de que o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*, *H. seropedicae* e *R. capsulatus* está relacionado com a regulação por amônio, os resíduos de aminoácidos do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae*, nas posições 18, 40 e 52 (ARSÈNE et al., 1999; PASCHEN et al., 2001) e o aminoácido valina na posição 138 que se apresentou conservado nos três microrganismos, foram escolhidos para os ensaios de mutagênese sítio dirigida desenvolvidos no presente trabalho.

A seqüência de nucleotídeos que codifica para o domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* foi analisada para a elaboração de “primers” para a troca de aminoácidos. Os códons modificados estão apresentados na TABELA 5.

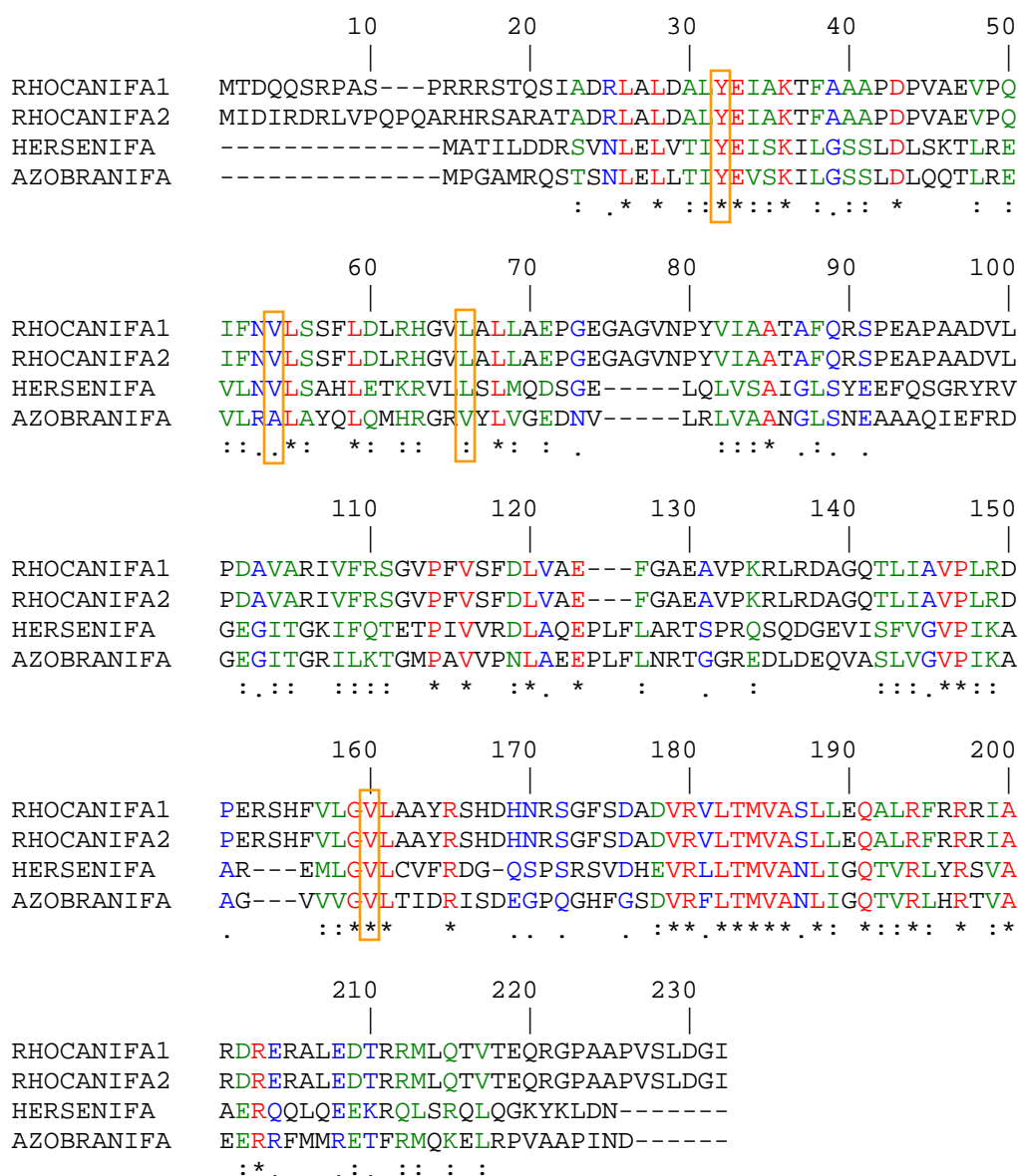


FIGURA 5 – COMPARAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO DOMÍNIO N-TERMINAL DAS PROTEÍNAS NIFA DE *A. brasiliense*, *R. capsulatus* e *H. seropedicae*. (Fonte: SCHIMDT, 2001)

Dados do Alinhamento:

Identidade (* em vermelho) : 33aa (14.2%)

Alta similaridade (: em verde) : 52aa (22.4%)

Baixa similaridade (. em azul) : 22aa (9.5%)

Sequência 1(RHOCANIFA1): Proteína NifA1 de *R. capsulatus* (226 resíduos). GenBank →P09434

Sequência 2(RHOCANIFA2): Proteína NifA2 de *R. capsulatus* (229 resíduos). GenBank →AAB91397

Sequência 3(HERSENIFA): Proteína NifA de *H. seropedicae* (202 resíduos). GenBank →P27713

Sequência 4(AZOBRANIFA): Proteína NifA de *A. brasiliense* (204 resíduos). GenBank →P300667

A comparação foi realizada através do programa Clustalw.

Os aminoácidos selecionados para este estudo de mutagenese estão destacados nos retângulos laranja

TABELA 5 - CÓDONS ALTERADOS PARA OS ESTUDOS DE MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA

Domínio N-terminal de NifA de <i>H. seropedicae</i>			
Selvagem		Mutante	
Aminoácido	Códon	Aminoácido	Códon
Tirosina (18)	TAC	Fenilalanina	TTC
Valina (40)	GTC	Glutamato	GAG
Leucina (66)	CTG	Glutamina	CAG
Valina (138)	GTG	Glutamato	GAG

Entre parênteses estão representadas as posições dos resíduos de aminoácidos selecionados para mutagênese. Em vermelho estão marcados os nucleotídeos que foram substituídos em cada códon.

5.1 MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA

Após análise da sequência do domínio N-terminal das proteínas NifA de *A. brasilense*, *R. capsulatus* e *H. seropedicae*, foram escolhidos para mutagênese os resíduos 18, 40, 52 e 138 (FIGURA 5). Duas estratégias foram utilizadas baseadas na amplificação da sequência codificadora para o domínio N-terminal. Os “primers” mutagênicos utilizados e os códons trocados estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

5.1.1 Obtenção de Mutantes Utilizando “Primers” Mutagênicos Complementares

Por esta técnica foram produzidas sequências de nucleotídeos do domínio N-terminal que apresentaram o resíduo de tirosina na posição 18 substituído por fenilalanina (Y18F) e resíduo de leucina na posição 52 substituído por glutamina (L52Q), pois para cada “primer” mutagênico utilizado havia a sequência complementar em outro “primer” no sentido oposto (LING & ROBINSON, 1997).

Ao todo foram realizadas três reações de PCR para produzir cada domínio N-terminal com as mutações pontuais desejadas (FIGURA 6). Na primeira PCR foram utilizados os “primers” HsnifA1 e MUTY18F-R ou MUTL52Q-R (TABELA 4), o produto destas amplificações apresentaram 66 e 161 pares de bases respectivamente (FIGURA 7), que foram posteriormente purificados (item 4.10.2). Em uma segunda PCR foram utilizados os “primers” MUTY18F-U ou MUTL52Q-U (TABELA 4) em conjunto com o “primer” HsnifA3A, cujos produtos de 560 e 460 pares de bases, respectivamente, também foram purificados (item 4.10.2).

Os fragmentos purificados obtidos destas duas primeiras PCRs foram unidos em uma terceira PCR e, utilizando-se da complementaridade dos “primers” mutagênicos, foi possível obter a sequência do domínio N-terminal inteira com a mutação inserida sem a necessidade do DNA molde contida no plasmídeo pEMS130, utilizando-se apenas nesta reação os “primers” HsnifA1 e HsnifA3A, e os reagentes necessários (FIGURA 7).

Os produtos desta terceira PCR foram posteriormente clonados no vetor pGEM-T e seqüenciados (item 4.7.1 e 4.8).

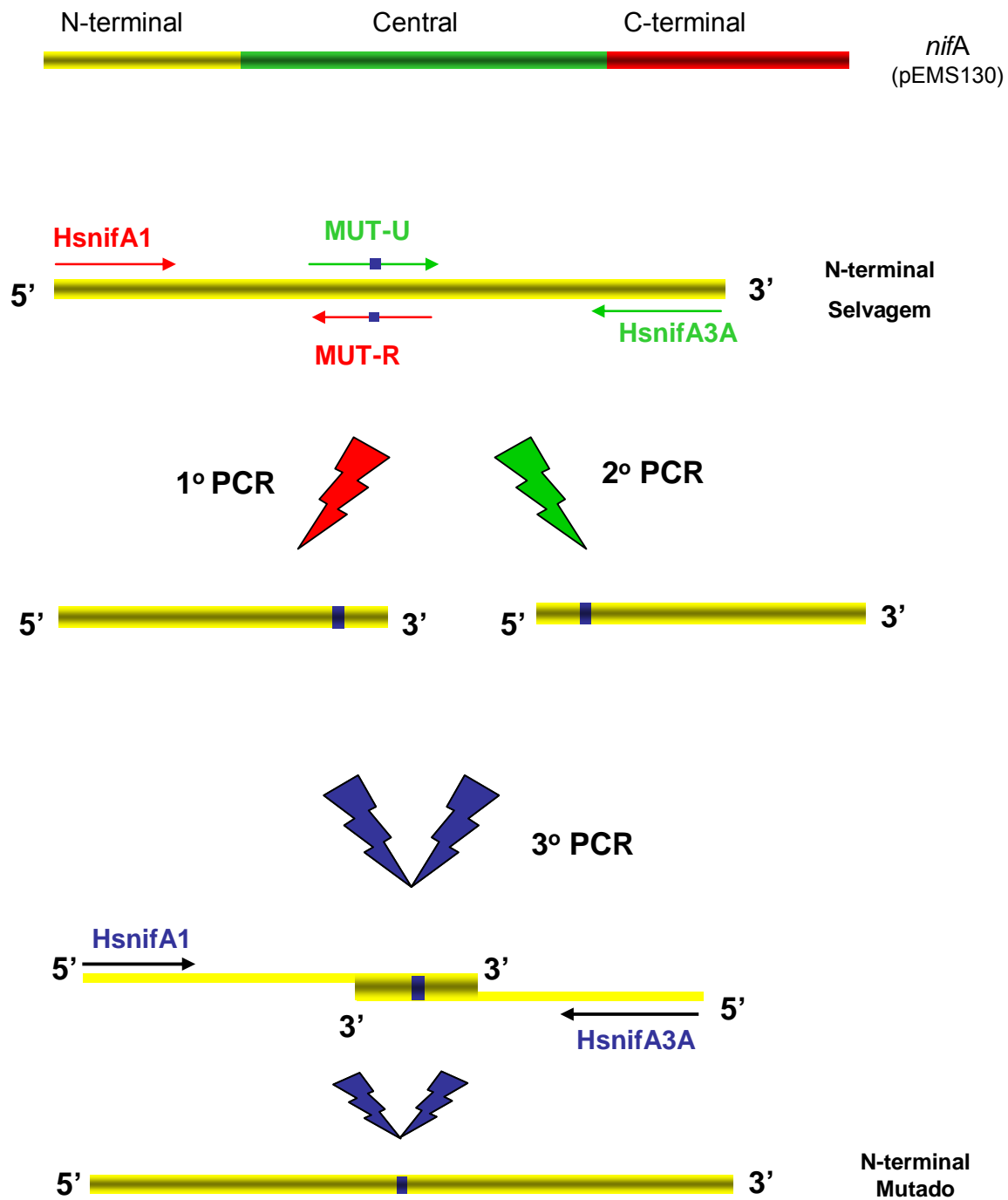


Figura 6 - Esquema geral da estratégia de mutagenese sítio dirigida utilizando “primers” mutagênicos complementares. As cores das setas correspondem aos “primers” utilizados em cada PCR.

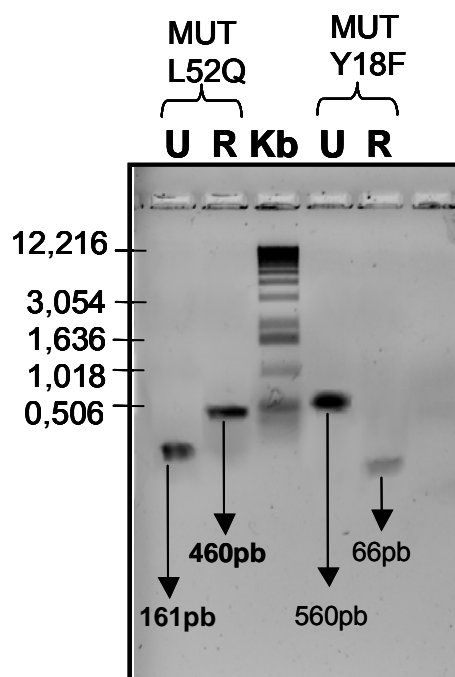


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1X com os produtos das duas primeiras PCRs para as trocas dos resíduos de L52 por Q e Y18 por F. U - “primer” no sentido universal; R - “primer” no sentido reverso. Kb = padrão de tamanho molecular 1kb Ladder. Para cada fragmento obtido estão indicados com setas os tamanhos. O DNA foi corado com brometo de etídeo e a imagem capturada em um sistema de vídeo-documentação.

5.1.2 Obtenção de Mutantes Utilizando “Megaprimers”

Uma vez que se dispunha de um único “primer” mutagênico para a alteração dos códons da valina, nas posições 40 e 138, para códons de glutamato, foi escolhido o método de mutagênese sítio-dirigida que se utiliza “megaprimers” (LING & ROBINSON, 1997). Nesta técnica foram necessárias duas reações de amplificação em cadeia pela DNA polimerase (PCR) (Figura 8).

Para a obtenção da seqüência do domínio N-terminal NifA com a mudança do códon correspondente à valina na posição 40 por glutamato foram utilizados os “primers” HsnifA1 e MUTV40E-R em uma primeira reação de amplificação, que resultou em um fragmento de DNA que apresenta 130pb (Figura 9). Este foi então purificado por gel de agarose de baixo ponto de fusão (item 4.10.2) e posteriormente utilizado como “megaprimer” (NIFAMUTV40E) em uma segunda PCR juntamente com o “primer” HsnifA3A (FIGURA 8).

Na construção do mutante V138E , foram utilizados os “primers” HsnifA3A e MUTV138E-U na primeira PCR e foi obtido um fragmento de 205pb (FIGURA 9). Este foi purificado por gel de agarose de baixo ponto de fusão (item 4.10.2) e posteriormente utilizado como “megaprimer” (NIFAMUTV138E) em uma segunda reação de amplificação juntamente com o primer HsnifA1 (FIGURA 8).

As seqüências codificadoras para os domínios N-terminais produzidos nestes ensaios de mutagênese foram clonadas no vetor pGEM-T e seqüenciados para a confirmação da inserção das mutações (item 4.7.1 e 4.8).

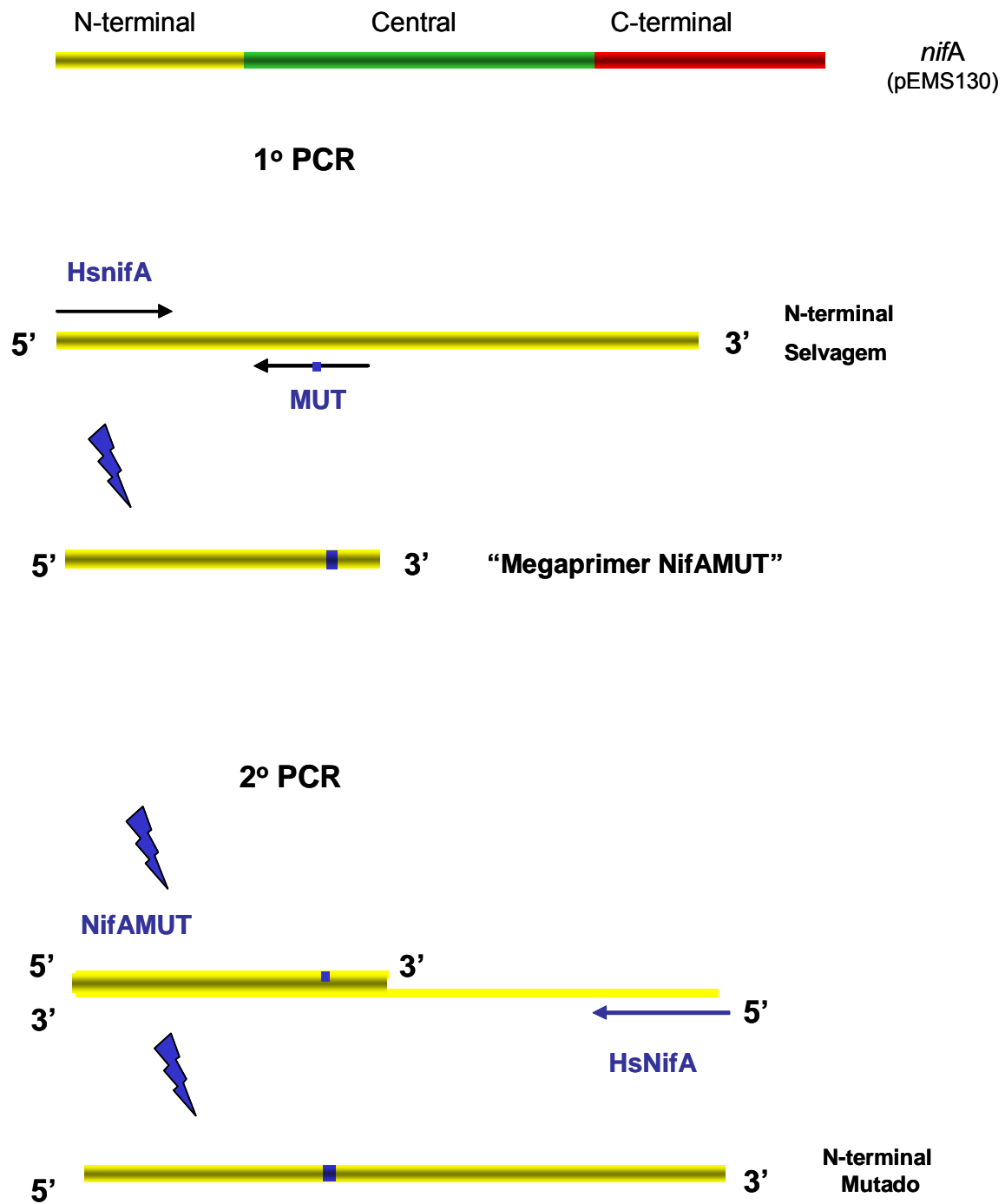


Figura 8 - Esquema geral da estratégia de mutagênese sítio dirigida utilizando "megaprimers" mutagênicos.

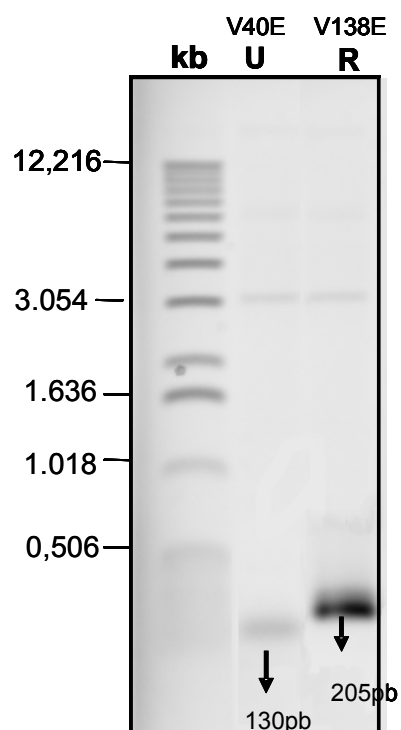


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1X com os produtos das duas primeiras PCRs para as trocas dos resíduos de V40 e V138 por E. U - “primer” no sentido universal; R - “primer” no sentido reverso. Kb = padrão de tamanho molecular 1kb Ladder. Para cada fragmento obtido estão indicados com setas os tamanhos. O DNA foi corado com brometo de etídeo e a imagem capturada em um sistema de vídeo-documentação.

5.2 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS MUTAGENIZADOS EM VETOR PARA SEQUENCIAMENTO

Os fragmentos de DNA produzidos por mutagênese sítio-dirigida foram clonados no vetor pGEM-T (figura 10) utilizando a técnica de clonagem TA, aproveitando-se da atividade de transferase terminal da maioria das enzimas *Taq* DNA polimerases, que adicionam preferencialmente um resíduo de adenosina na extremidade 3' da dupla fita ponta cega dos produtos de amplificação (ZHOU & GOMEZ-SANCHES, 2000). Esta propriedade facilita a hibridização com a timina da extremidade 3' complementar do vetor linearizado. Os produtos destas clonagens passaram a compor a série dos plasmídeos pLET.

Inicialmente, a presença das mutações Y18F e V40E nas seqüências de DNA correspondentes ao domínio N-terminal foi confirmada por análise de restrição, já que os “primers” mutagênicos utilizados continham sítios para a endonucleases de restrição *SacI* (dados não mostrados). Em seguida, a fim de se obter informações mais precisas das mutações pontuais e da integridade da seqüência do DNA, os DNA-insertos dos plasmídeos pLETs foram seqüenciados utilizando os “primers” universal e reverso (TABELA 4) que se alinham a montante e a jusante respectivamente ao sítio de clonagem TA do vetor. Após a análise das seqüências pelos programas BioEdit (HALL, 1999) e ClustalW (THOMPSON et al., 1997), foi confirmada a presença de mutação no domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* nos seguintes clones: pLETY18F, que apresenta a troca da tirosina na posição 18 por fenilalanina; pLETL52Q que apresenta a troca do resíduo de leucina na posição 52 por glutamina; pLETV138E que apresenta a troca da valina na posição 138 por glutamato; pLET2 que além de apresentar a mutação observada no clone anterior, contém ainda a troca do glutamato na posição 134 por valina e pLET4 que contém as duas mutações presentes no pLET2 mais a troca da isoleucina na posição 96 por valina e da arginina na posição 157 por histidina.

O aparecimento de mutações aleatórias, observadas nos clones pLET2 e pLET4 deve-se, provavelmente, a uma variação inadequada da concentração de

desoxinucleotídeos trifosfatados e cloreto de magnésio durante os ensaios de mutagênese que podem ter induzido a enzima *Taq* DNA polimerase a inserir bases trocadas em uma frequência maior do que o esperado (LIN-GOERKE et al, 1997).

No caso do clone pLETV40E, apesar de detectada a inserção da mutação pelo perfil de restrição, o seqüenciamento mostrou a deleção de uma base localizada adjacente à extremidade 3' do "primer" mutagênico, provocando desvio da fase de leitura do restante do domínio. Em uma análise acurada na seqüência de nucleotídeos do "primer" mutagênico MUTV40E, constatou-se que o nucleotídeo situado na extremidade 3' deste "primer" não apresentava complementaridade com o nucleotídeo correspondente na seqüência codificadora deste domínio, pois no lugar de uma citosina havia uma guanina. Provavelmente por esta falta de complementaridade na região da hidroxila reativa e por uma conformação inadequada na fita de DNA molde (pEMS130), a enzima *Taq* DNA polimerase foi capaz de sintetizar o restante do domínio, no entanto ocultando o nucleotídeo que se encontrava adjacente a esta citosina. Desta forma, este clone não foi utilizado nas etapas seguintes deste trabalho.

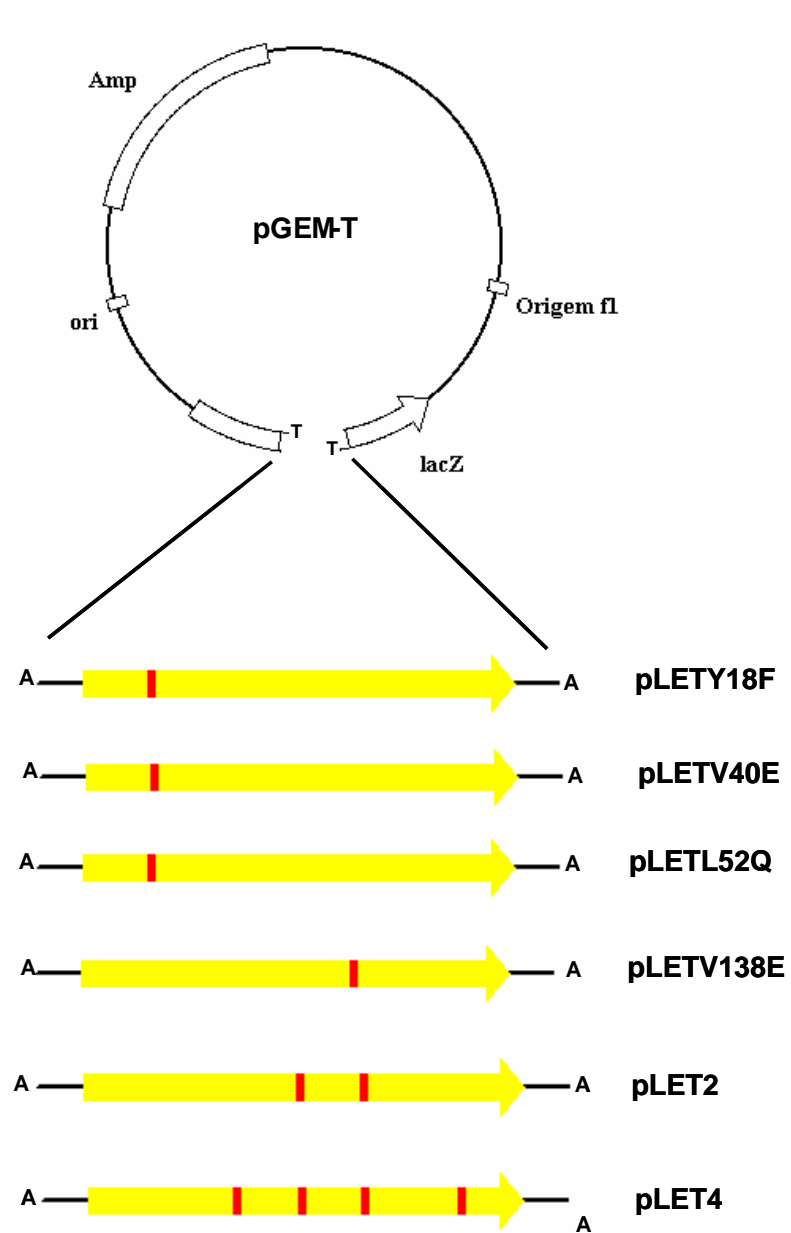


FIGURA 10 - ESQUEMA DE CLONAGEM DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS DA PROTEÍNA NIFA *H. seropedicae* NO VETOR pGEM-T

Os produtos de mutagenese sítio-dirigida foram clonadas no vetor pGEM-T (item 4.7.1) e seqüenciados (item 4.8) utilizando os “primers” reverso e universal que se alinham com o vetor. Os traços em vermelho representam a inserção das mutações.

5.3 EXPRESSÃO DO DOMÍNIO N-TERMINAL DA PROTEÍNA NifA SELVAGEM E DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS MUTANTES

Para a expressão dos domínios N-terminais selvagem e mutantes foram utilizados os vetores pET28a, pT7-7 e pDK7 (TABELA 2). Os vetores pET28a e pT7-7 possuem o promotor do fago T7 que é reconhecido pela RNA polimerase do fago T7 expressas sob indução na estirpe de *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS. Deste modo na presença de um indutor a T7 RNA polimerase é sintetizada e transcreve com alta eficiência a seqüência de DNA clonada, a partir do promotor T7 (TABOR & RICHARDSON, 1985). O vetor pDK7 possui o promotor *tac*, que contém a região -10 do promotor *lac* UV5 e a região -35 do promotor *trp* (AMANN et al., 1983).

As proteínas expressas a partir destes vetores foram analisadas quanto a solubilidade destes domínios.

5.3.1 Expressão do Domínio N-terminal a partir do Vetor pET28a

As seqüências mutantes codificadoras para o domínio N-terminal da proteína NifA, contidas no vetor pGEM-T foram subclonadas com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* (item 4.7.2) no vetor pET28a originando os plasmídeos da série pETLET (TABELA 2 e FIGURA11).

As proteínas expressas a partir desta construção apresentavam, em sua porção N-terminal, seqüência de aminoácidos composta por seis resíduos de histidinas

(seqüência His tag), que permitirá, futuramente, a utilização de cromatografia de afinidade no processo de purificação.

Para a expressão dos domínios N-terminais mutantes (este trabalho) e selvagem (ETTO, 2003), os plasmídeos correspondentes foram introduzidos em *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS. As células foram induzidas com 0,5 mmol/L IPTG a 30° C durante três horas (item 4.11). O uso de IPTG induziu a síntese da T7 RNA polimerase e desbloqueou a região operadora situada a montante do RBS (“Ribosome Binding Site”) do vetor que está sob efeito do repressor *lacI^q*, permitindo desta forma a expressão das proteínas de fusão.

Após o período de indução o extrato de células foi coletado, submetido a uma lise por sonicação e posteriormente separados por centrifugação em fração solúvel e insolúvel (item 4.11). As frações foram analisadas em SDS-PAGE (item 4.10.3) e os resultados estão mostrados nas figuras 12 e 13. Todas as proteínas recombinantes estiveram presentes predominantemente na fração insolúvel. Monteiro (2001) já havia observado que o domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* é insolúvel quando superexpressa em *E. coli*.

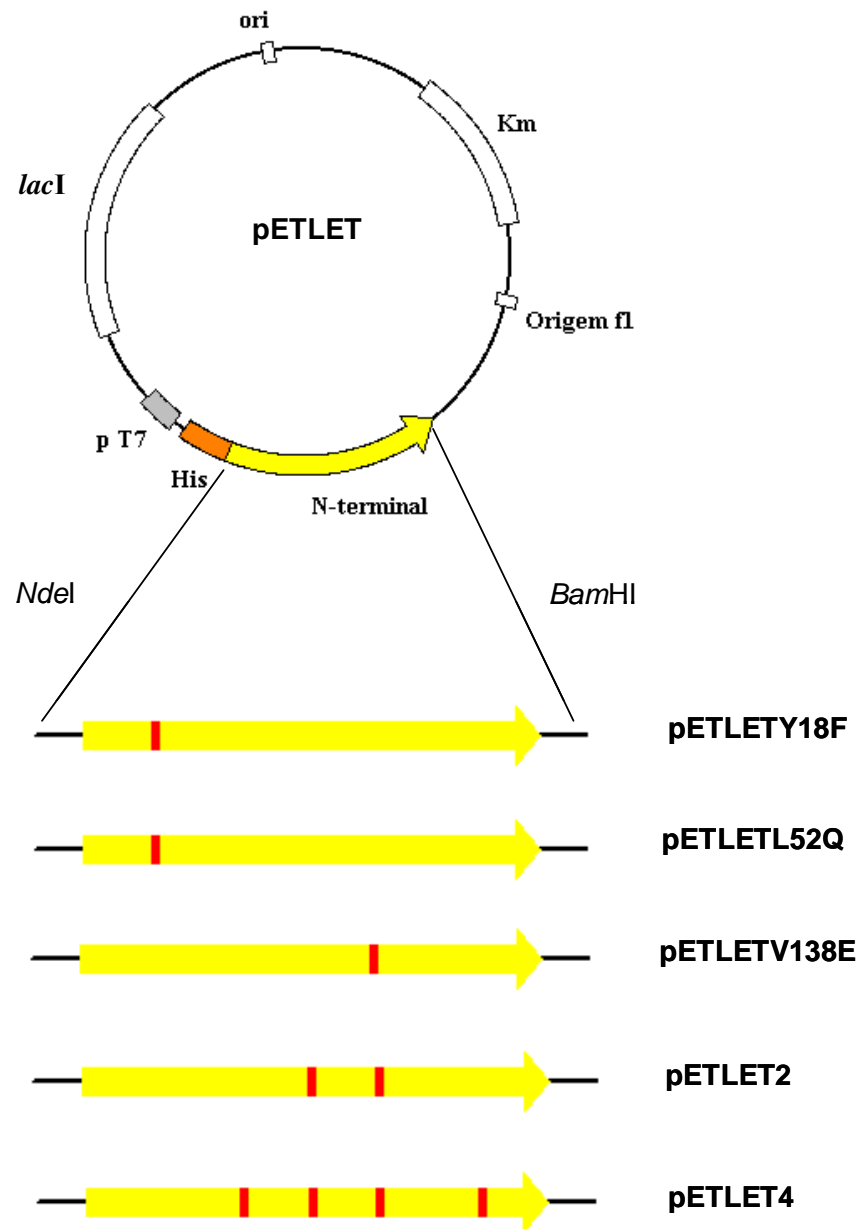


FIGURA 11 - ESQUEMA DE CLONAGEM DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS MUTANTES DA PROTEÍNA NIFA *H. seropedicae* NO VETOR pET28a

Estas construções foram obtidas através da subclonagem dos plasmídeos da série pLET no vetor pET28a, originando os plasmídeos da série pETLET (item 4.7.2). Os traços em vermelho representam a inserção das mutações.

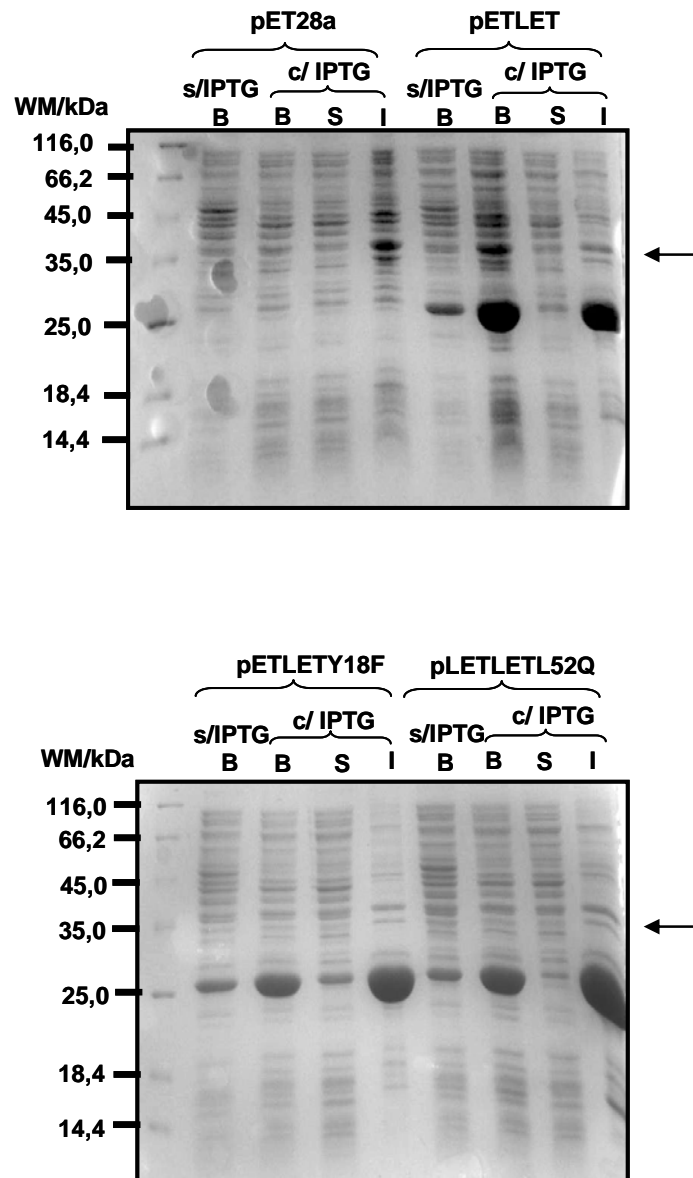


FIGURA 12 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS PLASMÍDEOS DA SÉRIE pETLET. Eletroforese em gel 15% de poliacrilamida desnaturante do extrato total (B), solúvel (S) e insolúvel (I) de células após indução com 0.5 mM IPTG. O extrato total de células não induzidos estão indicados com s/IPTG. Os marcadores de massa molecular estão indicados (WM/kDa). As setas indicam as proteínas superexpressas. As proteínas foram coradas com Comassie Blue.

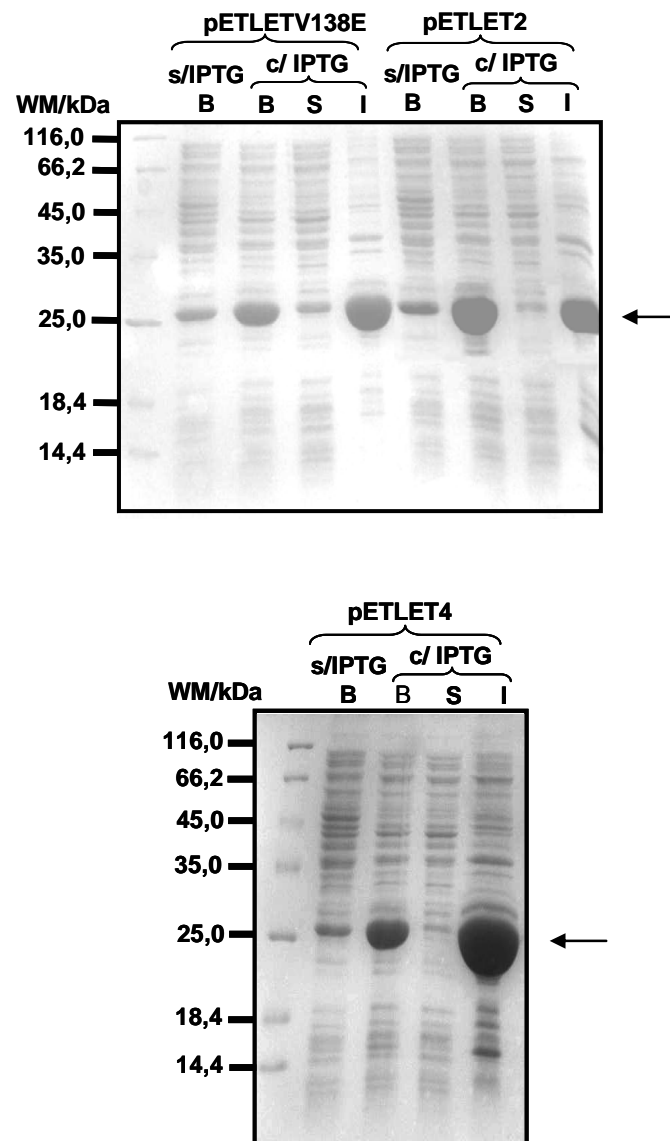


FIGURA 13 - Análise da expressão dos plasmídeos da série pETLET

Eletroforese em gel 15% de poliacrilamida desnaturante do extrato total (B), solúvel (S) e insolúvel (I) de células após indução com 0.5 mM IPTG. O extrato total de células não induzidos estão indicados com s/IPTG. Os marcadores de massa molecular estão indicados (WM/kDa). As setas indicam as proteínas superexpressas. As proteínas foram coradas com Comassie Blue.

5.3.2 Expressão dos Domínios N-terminais a partir do vetor pDK7

Os insertos dos plasmídeos pETLET foram subclonados nos vetores pDK7 utilizando as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III, de modo que a sequência codificadora para os resíduos de seis aminoácidos de histidina e para o sítio RBS do vetor pET28a fossem também carregados (item 4.7.2).

Como resultado, foram obtidos os plasmídeos da série pDKLET (TABELA 2 e FIGURA 14). Estes plasmídeos expressam o domínio N-terminal a partir de um promotor *tac*, que apresenta um nível de expressão mais baixo quando comparado com o promotor T7.

Para a expressão dos domínios N-terminais selvagem e mutantes, os plasmídeos da série pDKLET foram transformados em *E. coli* 7118. Estas células também foram induzidas com IPTG, já que o promotor *tac* é reprimido em estirpes *LacI*^q. Após esse período de indução o extrato de células foi separado em frações solúvel e insolúvel (item 4.11) e o perfil eletroforético das proteínas foi analisado em géis de SDS-PAGE (item 4.10.3) (FIGURA 15 E 16).

Semelhante ao observado para os plasmídeos da série pETLET, as proteínas selvagem e mutantes permaneceram na fração insolúvel, mesmo tendo os seus níveis de expressão reduzidos. Desta forma descartou-se a hipótese de que o alto nível de expressão do promotor T7 resulta na formação de agregados protéicos que precipitassem a proteína, fazendo-a ficar na porção insolúvel.

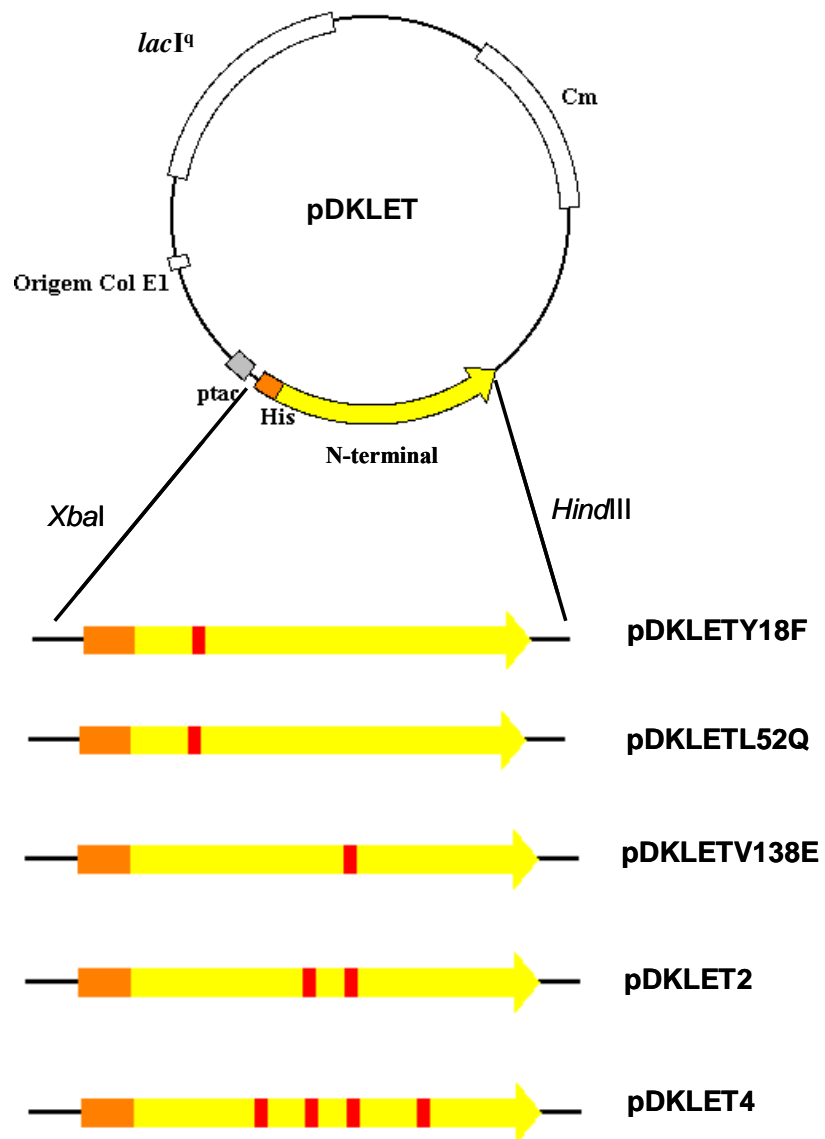


FIGURA 14 - ESQUEMA DE CLONAGEM DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS DA PROTEÍNA NIFA *H. seropedicae* NO VETOR pDK7

Estas construções foram obtidas através da subclonagem dos plasmídeos da série pETLET no vetor pDK7, originando os plasmídeos da série pDKLET (item 4.7.2). Os traços em vermelho representam a inserção das mutações.

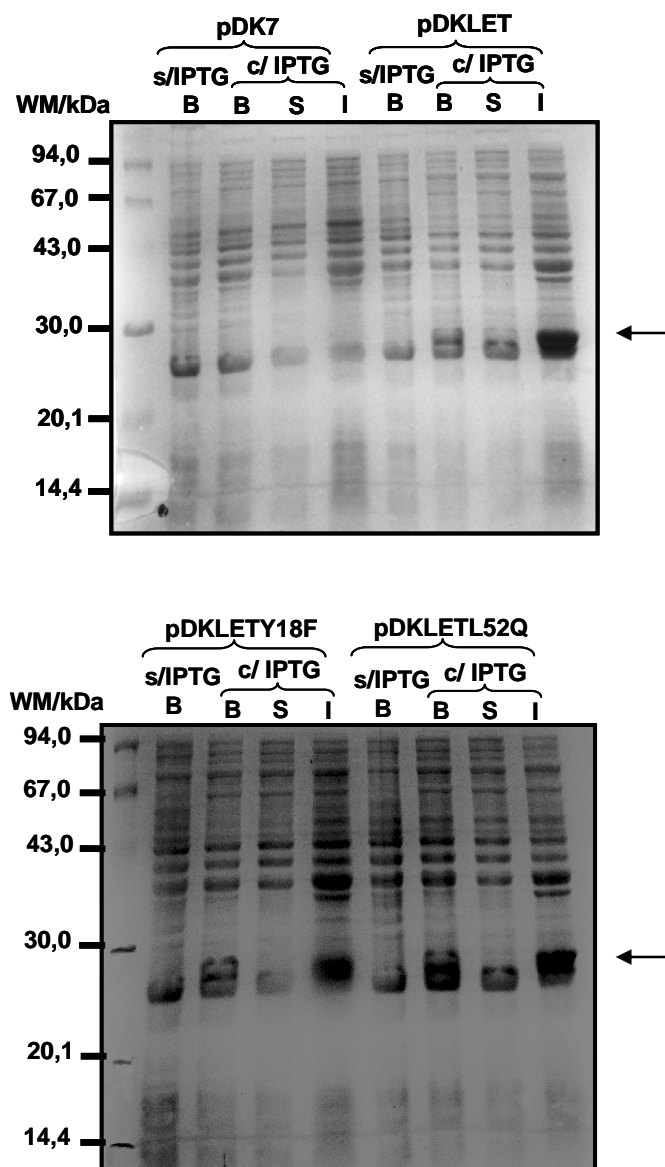


FIGURA 15 - Análise da expressão dos plasmídeos da serie pDKLET

Eletroforese em gel 15% de poliácridamida desnaturante do extrato total (B), solúvel (S) e insolúvel (I) de células após indução com 0.5 mM IPTG. O extrato total de células não induzidos estão indicados com s/IPTG. Os marcadores de massa molecular estão indicados (WM/kDa). As setas indicam as proteínas superexpressas. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

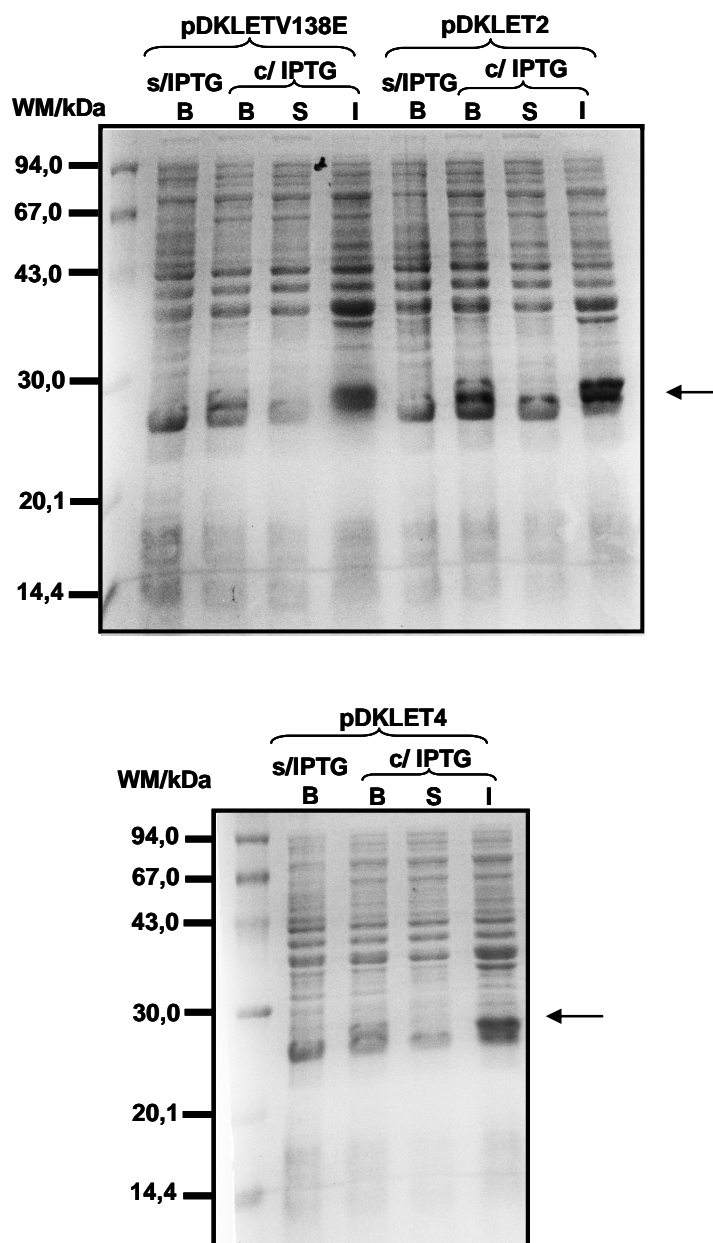


FIGURA 16 - Análise da expressão dos plasmídeos da serie pDKLET

Eletroforese em gel 15% de poliacrilamida desnaturante do extrato total (B), solúvel (S) e insolúvel (I) de células após indução com 0.5 mM IPTG. O extrato total de células não induzidos estão indicados com s/IPTG. Os marcadores de massa molecular estão indicados (WM/kDa). As setas indicam as proteínas superexpressas. As proteínas foram coradas com Comassie Blue.

5.3.3 Expressão dos Domínios N-terminais a partir do Vetor pT7-7

As seqüências codificadoras dos domínios N-terminais selvagem e mutantes presentes nos plasmídeos pETLETs (TABELA 2) foram em seguida subclonadas no vetor pT7-7 a partir dos sítios de restrição *NdeI*/*Bam*HI (item 4.7.2). A utilização da endonuclease de restrição *NdeI*, possibilitou a clonagem dos domínios sem a fusão N-terminal da cauda de histidina, já que o sítio de restrição desta enzima encontra-se a jusante da seqüência His-tag (FIGURA 17).

Os produtos destas subclonagens constituem a série pT7LET (TABELA 2 e FIGURA 17) e apresentam apenas os domínios de interesse que são expressos a partir de um promotor T7. Estes plasmídeos foram então transformados em *E. coli* BL21 (λ DE3) pLysS e a expressão foi induzida pela adição de IPTG (item 4.11).

Assim como nos dois ensaios anteriores, os extratos solúvel e insolúvel foram separados por centrifugação e os perfis eletroforéticos foram analisados. As proteínas expressas apresentaram uma massa molecular menor (+/- 22kDa) quando comparadas com as proteínas expressadas nas construções anteriores (pETLETs e pDKLETs com +/- 26kDa), devido a ausência da cauda de histidina (FIGURA 18 e19).

Todos os domínios encontraram-se predominantemente na fração insolúvel do extrato, descartando assim a idéia de uma provável interferência da cauda de histidina adicionada aos insertos, quando estes foram subclonados no vetor pET28a.

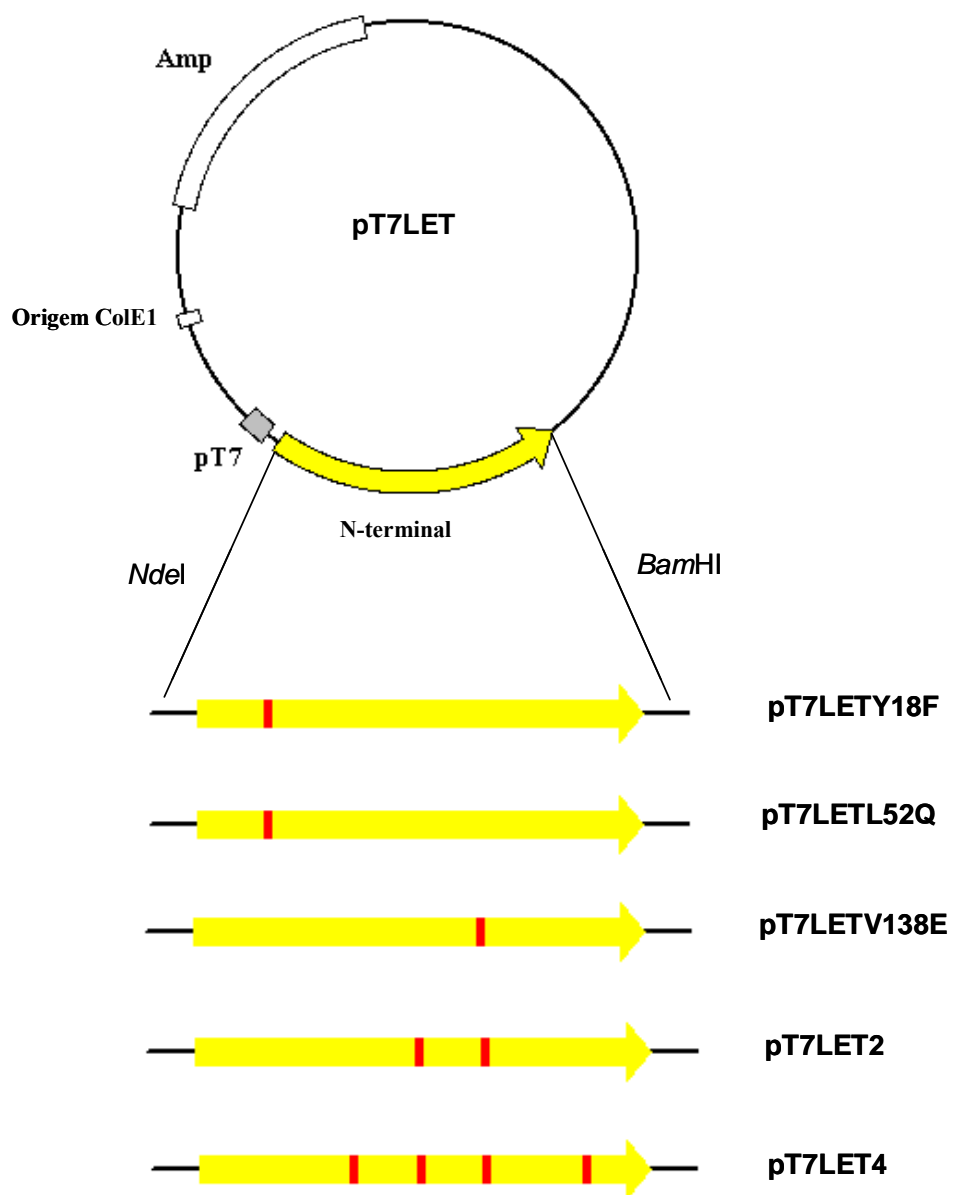


FIGURA 17 - ESQUEMA DE CLONAGEM DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS DA PROTEÍNA NIFA *H. seropedicae* NO VETOR pT7-7

Estas construções foram obtidas através da subclonagem dos plasmídeos da série pTLET no vetor pT7-7, originando os plasmídeos da série pT7LET (item 4.7.2). Os traços em vermelho representam a inserção das mutações.

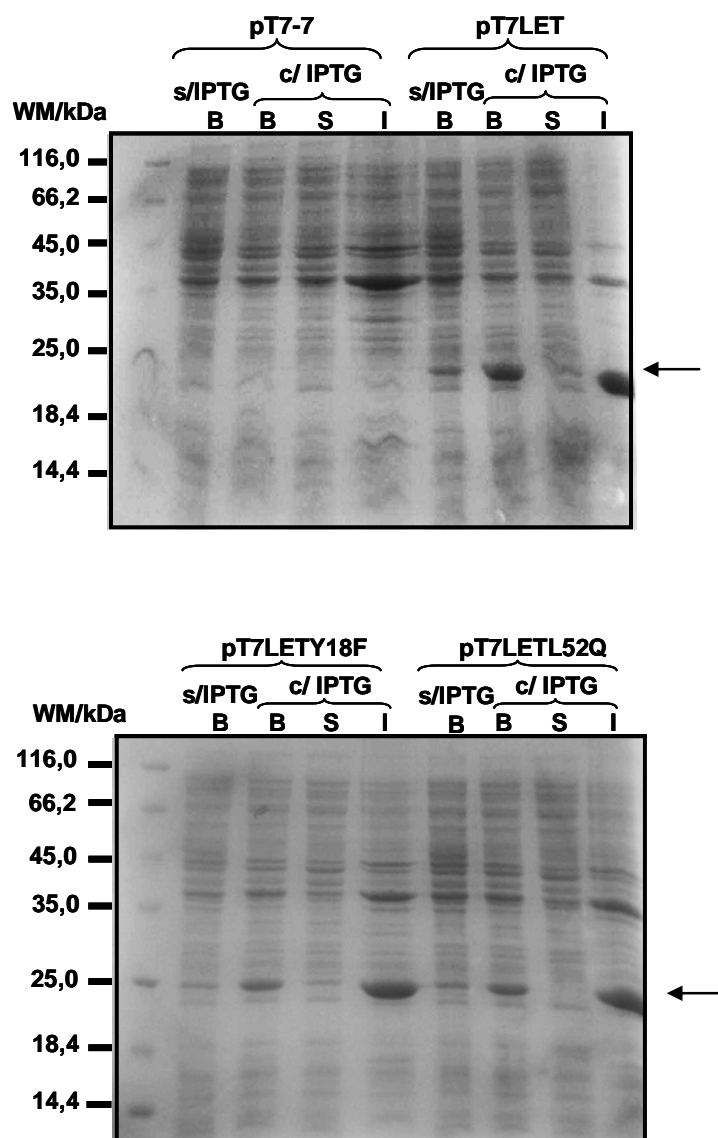


FIGURA 18 - Análise da expressão dos plasmídeos da série pT7LET

Eletroforese em gel 15% de poliácridamida desnaturante do extrato total (B), solúvel (S) e insolúvel (I) de células após indução com 0.5 mM IPTG. O extrato total de células não induzidos estão indicados com s/IPTG. Os marcadores de massa molecular estão indicados (WM/kDa). As setas indicam as proteínas superexpressas. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue.

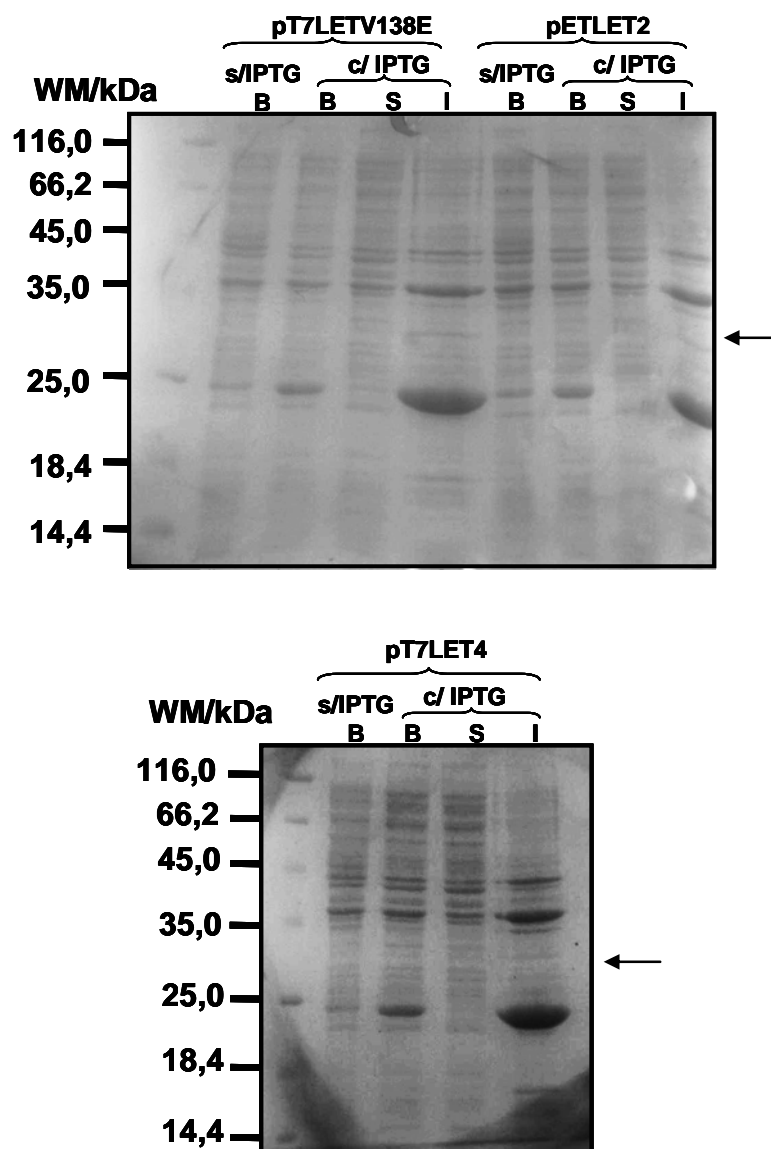


FIGURA 19 - Análise da expressão dos plasmídeos da série pT7LET

Eletroforese em gel 15% de poliacrilamida desnaturante do extrato total (B), solúvel (S) e insolúvel (I) de células após indução com 0.5 mM IPTG. O extrato total de células não induzidos estão indicados com s/IPTG. Os marcadores de massa molecular estão indicados (WM/kDa). As setas indicam as proteínas superexpressas. As proteínas foram coradas com Comassie Blue.

5.4 ANÁLISE FUNCIONAL DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS MUTANTES

O papel regulatório do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* em resposta aos níveis de amônio, foi sugerido em experimentos realizados com a proteína contendo apenas os domínios Central+C-terminal (N-truncada). Em um sistema heterólogo, a proteína NifA N-truncada apresentou atividade de ativador transcricional mesmo na presença de íons amônio (SOUZA et al., 1999 ; MONTEIRO et al., 1999a). Quando o domínio N-terminal foi co-expresso com a NifA N-truncada em *E. coli*, observou-se a retomada da regulação desta proteína por amônio (MONTEIRO et al., 1999b). Estudos in vitro realizados por Monteiro e colaboradores (2001) demonstraram que o domínio N-terminal interage com a proteína Central+C-terminal, inibindo tanto a sua capacidade de ligação ao DNA quanto a atividade de ATPase da proteína N-truncada, agindo portanto de forma negativa. Além disso, quando expressa em *E. coli* a proteína NifA selvagem encontra-se em uma forma inativa, provavelmente por ação do seu domínio N-terminal e devido a inexistência de um sinal/fator de ativação no nível necessário para ativá-la nesta enterobactéria (SOUZA et al., 1999). Com base nestes dados, as análises fisiológicas deste trabalho foram realizadas com os domínios N-terminais mutantes complementando “in trans” a proteína NifA N-truncada em *E. coli* para se investigar a influência dos resíduos de aminoácidos mutados na atividade do domínio N-terminal da proteína NifA.

Os plasmídeos da série pETLET foram co-expressos, em células de *E. coli* estirpe JM109 (λ DE3) contendo os plasmídeos pRAM2T7 (pT7-7::NifA N-truncada) e pRT22 (fusão *nifH*::*lacZ* de *K. pneumoniae*). A ativação transcricional foi confirmada pela ativação da expressão da fusão *nifH*::*lacZ*. Nesta fusão, a expressão do gene de β -galactosidase está sob controle do promotor do gene *nifH* de *K. pneumoniae* (TULI & MERRICK, 1988). Desta forma, foi possível verificar a propriedade regulatória dos domínios N-terminais mutantes sobre a proteína NifA N-truncada, na presença e ausência de amônio (item 4.12)

Tendo em vista que a proteína NifA N-truncada é sensível ao oxigênio, cujo nível celular é provavelmente regulado via um agrupamento de cisteínas presentes no

domínio central e região interdomínio (SOUZA et al., 1999; MONTEIRO et al., 1999), os ensaios foram realizados em condições de anaerobiose.

O nível basal de atividade de β -galactosidase em *E. coli* foi determinado em ensaios com células contendo somente a fusão *nifH::lacZ* ou seja, contendo somente o plasmídeo pRT22. Os demais transformantes analisados continham além deste plasmídeo, os plasmídeos pRAM2T7 e os plasmídeos da série pETLET (N-terminal selvagem e mutantes) (item 4.12.1).

Analisando os resultados apresentados na tabela 6, é possível verificar que as células de *E. coli* JM109 (λ DE3) carregando os plasmídeos pRT22 e o plasmídeo pRAM2T7 têm atividade de β -galactosidase na ausência de oxigênio, e tanto na presença quanto ausência de amônio. Estes dados confirmam novamente que o domínio Central+C-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* pode ativar a transcrição da fusão *nifH::lacZ* de *K. pneumoniae* em *E. coli* (SOUZA et al., 1999; MONTEIRO et al., 1999a). Quando o plasmídeo pETLET expressando o domínio N-terminal selvagem da proteína NifA estava também presente, a atividade do domínio Central+C-terminal diminuiu em 88,5% na presença de 20 mmol/L NH_4Cl , resultado concordante com o observado nos ensaios realizados por Monteiro e colaboradores (1999), em que a atividade reduziu em 70%.

A co-expressão dos domínios N-terminais mutantes com a proteína NifA N-truncada apresentou, em alguns casos, regulação por NH_4^+ . A expressão do plasmídeo pETLETY18F, que apresenta o resíduo de tirosina na posição 18 por fenilalanina, resultou na diminuição de 42,4% na atividade de β -galactosidase. Já os domínios contendo a mutação do resíduo de leucina por glutamina na posição 52 expresso pelo plasmídeo pETLETL52Q e o domínio tetra mutante contendo as mutações isoleucina por valina na posição 96; valina por glutamato na posição 134; glutamato por valina na posição 138 e arginina por histidina na posição 157 expresso a partir do plasmídeo pETLET4 apresentaram uma diminuição de apenas 5,6% e 17,7% respectivamente.

Os domínios mutantes presentes nos plasmídeos pETLETV138E e pETLET2, que expressam respectivamente o domínio N-terminal com uma troca do resíduo de aminoácido de valina por glutamato na posição 138; e o duplo mutante com a troca de glutamato por valina na posição 134 e valina por glutamato na posição 138, não

apresentaram alteração significativa na atividade com relação ao domínio selvagem, apresentando para o primeiro uma diminuição de 89,12% e para o segundo 88,02%.

As presenças dos domínios N-terminal e Central+C-terminal nos ensaios de β -galactosidase foram verificados em géis de poliacrilamida SDS-PAGE (FIGURA 20) e confirmados em ensaios de “immunoblotting” (FIGURA 21) utilizando anticorpos anti-N-terminal e anti-NifA-N-truncada (MONTEIRO, 2001). Os dois domínios foram expressos a partir do promotor T7 e a análise de SDS-PAGE mostrou que seus níveis de expressão foram similares. Assim as diferenças de atividade nesses ensaios não foram decorrentes da ausência ou da baixa expressão das proteínas analisadas.

TABELA 6 - EFEITO DA CO-EXPRESSÃO DOS DOMÍNIOS N-TERMINAIS MUTANTES SOBRE O DOMÍNIO CENTRAL+C-TERMINAL (N-TRUNCADA) DE *H. seropedicae* EM *E. coli*

Plasmídeos ^a		Atividade de β -galactosidase ^b (valor+/-DP) ^c	
N-Truncada	N-terminal	-N	+N
pRAM2T7	-	486 +/- 23	517 +/- 15
pRAM2T7	pET28a	403 +/- 19	391 +/- 18
pRAM2T7	pETLET (selvagem)	384 +/- 18	44 +/- 5
pRAM2T7	pETLET-Y18F	289 +/- 11	166 +/- 10
pRAM2T7	pETLET-L52Q	305 +/- 21	288 +/- 16
pRAM2T7	pETLET-V138E	344 +/- 10	37 +/- 4
pRAM2T7	pETLET-2	346 +/- 15	41 +/- 4
pRAM2T7	pETLET-4	349 +/- 14	286 +/- 12

a) *E. coli* estirpe JM109 (λ DE3) contendo o gene repórter *nifH::lacZ* no plasmídeo pRT22 e os plasmídeos indicados expressando os domínios correspondentes indicados

b) Ativação da transcrição do promotor *nifH* mediada pela proteína NifA N-truncada, medida pela atividade de β -galactosidase em unidades Miller, em culturas induzidas por 8 horas na presença ou ausência de 20 mmol.L⁻¹ NH₄Cl, (+N) ou (-N) respectivamente.

c) Estes dados são medias de pelo menos quatro experimentos diferentes. DP = desvio padrão.

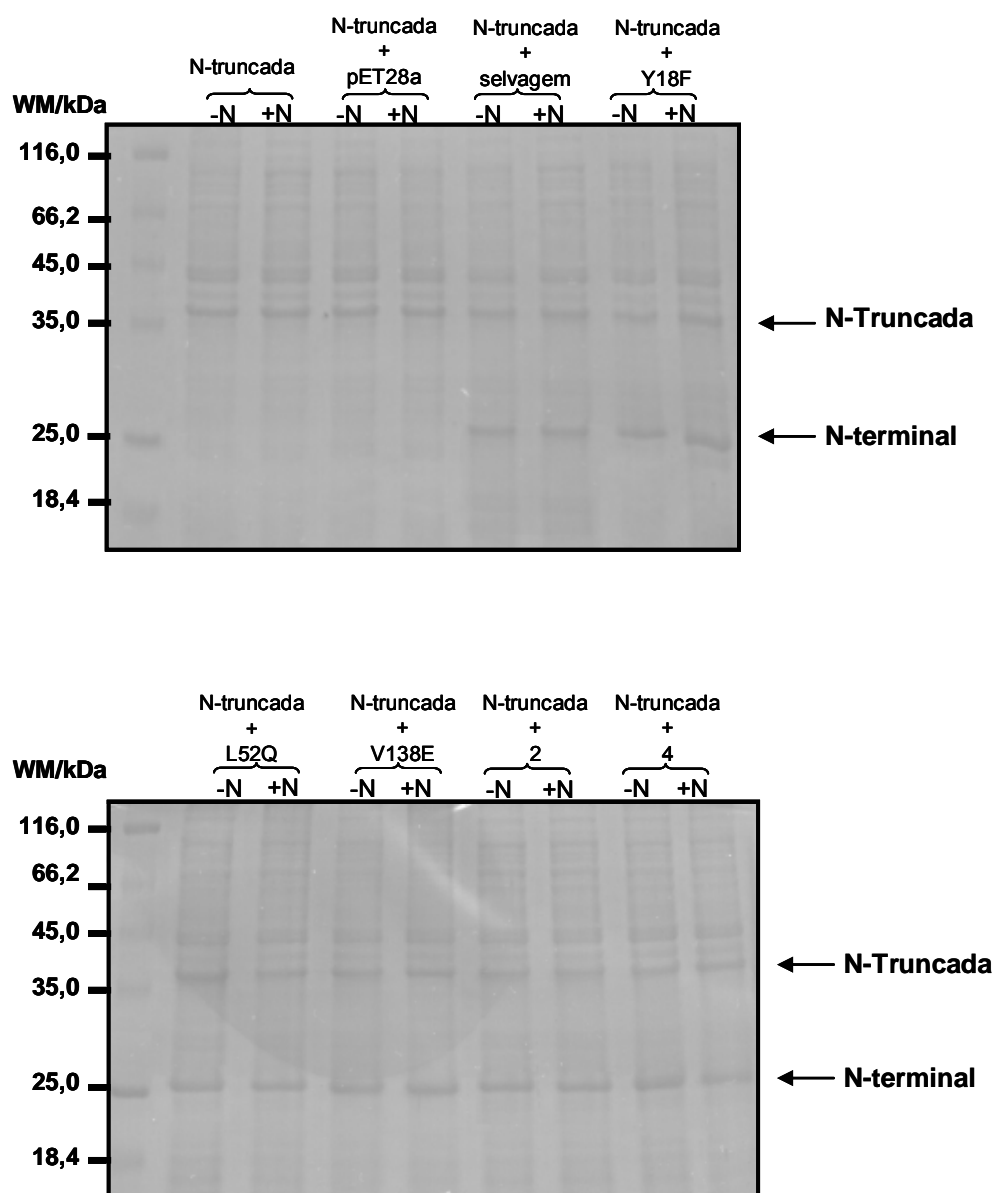


FIGURA 20 - ANÁLISE DOS EXTRADOS CELULARES UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE β -GALACTOSIDASE

Determinação da presença dos domínios N-terminais e Central+C-terminal em gel de poliacrilamida aplicando aproximadamente 7 μ g de proteínas presentes nos extratos celulares dos ensaios fisiológicos. Os domínios N-terminais representaram entre 11% a 19% do extrato bruto analisado, enquanto o domínio Central+C-terminal variou entre 8% a 15% deste total (item 4.8.3).

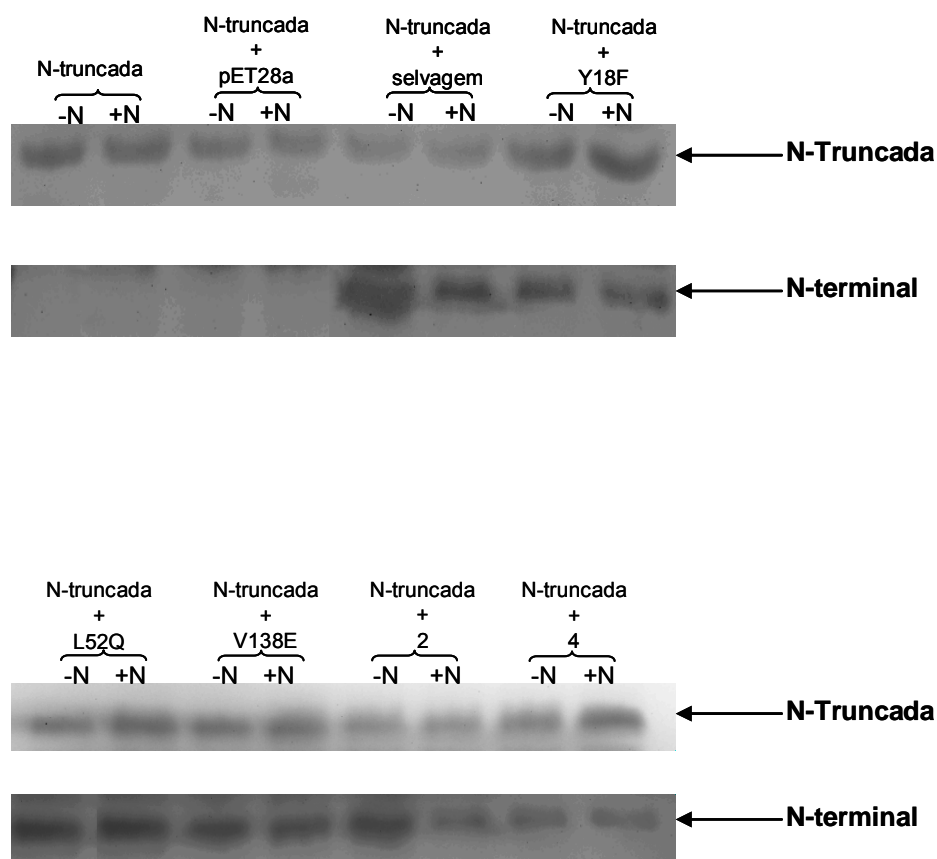


FIGURA 21 - IMUNODETECÇÃO DO DOMÍNIO N-TERMINAL E DA PROTEÍNA NIFA N-TRUNCADA DE *H. seropedicae* EXPRESSA EM *E. coli*

As amostras dos ensaios de β -galactosidase foram submetidas a análise por “Immunoblot” (item 4.14.3) com anticorpos policlonais anti-N-terminal e anti- Δ N-NifA para confirmar a presença destes domínios nos sistemas fisiológicos analisados.

Nos ensaios fisiológicos foi possível confirmar que o domínio N-terminal não é necessário para a ativação da transcrição pela proteína NifA de *H. seropedicae* (MONTEIRO et al., 1999a ;SOUZA et al., 1999), situação também observada para as proteínas NifA de *A. brasilense* (ARSÈNE et al., 1996) e *B. japonicum* (FISHER et al., 1988). Diferente do observado em *R. capsulatus*, onde o domínio N-terminal além de ter uma função regulatória é essencial para a atividade da proteína NifA (PASCHEN et al., 2001).

A co-expressão do domínio N-terminal selvagem juntamente com o domínio Central+C-terminal, mostrou que o domínio N-terminal é capaz de inibir a capacidade de ativadora de transcrição da proteína N-truncada na presença de íons amônio, resultado já observado por Monteiro e colaboradores (1999), que demonstraram ainda que quando o domínio N-terminal era expresso em maior quantidade que a proteína N-truncada, ocorria a inativação do domínio Central+C-terminal independente ou não da presença de íons NH_4^+ , sugerindo uma provável interação entre as duas proteínas. Desta forma a interação entre o domínio N-terminal e a NifA N-truncada provocaria a inibição da atividade do domínio Central+C-terminal, dado corroborado pelos resultados negativos de atividade da proteína NifA íntegra em *E. coli* (SOUZA et al., 1999). No entanto, a presença da proteína GlnB de *A. brasilense* ativou a proteína NifA de *H. seropedicae* em *E. coli*, sugerindo assim a necessidade de uma proteína ou um fator/sinal para a sua atividade (MONTEIRO, 2001). Resultado muito próximo a este, foi também observado expressando ambos GlnB e NifA de *A. brasilense* também em *E. coli*, no entanto neste caso, a recuperação da atividade só ocorreu em condições de baixo amônio (ARAÚJO et al., 2004).

Esses resultados sugerem um mecanismo de controle da proteína NifA por parte do domínio N-terminal, semelhante ao que ocorre em γ -Proteobactéria e que envolve uma interação específica desta proteína com a proteína NifL (BERGER et al., 1994). Em *K. pneumoniae*, na ausência de GlnK a proteína NifL está sempre inibindo a atividade de NifA sob condições de desrepressão (HE et al., 1998; JACK et al., 1999). O mesmo resultado também foi obtido quando NifL estava presente em um nível maior do que NifA (DRUMMONT et al., 1990). Na presença de oxigênio ou íons amônio, ocorre a formação de um complexo entre NifL-NifA na proporção de 1:1. Neste microrganismo a

proteína sensora de nitrogênio GlnK interage com NifL e NifA sob condições limitantes de nitrogênio, resultando na dissociação deste complexo e posterior ativação de NifA (STIPS et al., 2004). Em *A. vinelandi* foi observado também no sistema NifLA a formação de um complexo inativo 1:1, dependente dos níveis de nitrogênio fixado e oxigênio *in vivo*, o que aparentemente faz com que NifL mude de uma forma de baixa afinidade pela NifA para uma forma de alta afinidade (HILL et al., 1996; MONEY et al., 2001). Ensaio *in vitro* de imunoprecipitação têm mostrado que a proteína GlnK, não uridilada, ou seja, em condição de excesso de nitrogênio, interage com NifL para inibir a atividade de NifA (LITTLE et al., 2002).

Neste microrganismo ainda foi verificado que a proteína NifL inibe a capacidade de ligação ao DNA, a atividade de ATPase e de ativadora de transcrição da proteína NifA (AUSTIN et al., 1994; BARRET et al., 2001; MARTINEZ-ARGUDO et al., 2004b). Resultado semelhante ao obtido por Monteiro e colaboradores (2001) em estudos de interação entre o domínio N-terminal e N-truncada de *H. seropedicae*.

Apesar de mecanismos diferentes com relação à atividade desta proteína do tipo PII (GlnK) em resposta ao nível de amônio no sistema NifLA, fica evidente a participação como regulador negativo da proteína NifL sobre a NifA. Estes dados reforçam a hipótese de uma provável semelhança funcional entre o domínio N-terminal de *H. seropedicae* e a proteína NifL e permitem supor que provavelmente esta interação negativa do domínio N-terminal no controle da atividade do domínio Central seja via uma molécula sinal do tipo PII (MONTEIRO, 2001).

As análises fisiológicas realizadas com os domínios N-terminais mutantes, mostraram que o domínio mutado na posição Y18F foi parcialmente inativado na presença de amônio. A substituição da tirosina por fenilalanina levou a perda da hidroxila do anel aromático. Desta forma um provável resíduo de interação com outras moléculas/proteínas pode ter sido perdido ou uma mudança conformacional pode ter ocorrido de modo a amenizar o efeito inibitório do domínio N-terminal sobre a proteína N-truncada. Considerando-se a similaridade tanto na regulação do processo de fixação de nitrogênio, quanto na seqüência de aminoácidos dos domínios N-terminais de *H. seropedicae* e *A. brasilense*, poder-se-ia ainda sugerir que essa mutação possa ter abolido a necessidade de uma ativação via proteína PII. No entanto houve regulação,

ainda que parcial por amônio. Em *A. brasilense* a mesma mutação permitiu o escape do controle da proteína GlnB mas não dos níveis de nitrogênio fixado (ARSÈNE et al., 1999).

O domínio N-terminal com a substituição L52Q apresentou diminuição do efeito inibitório sobre a proteína NifA N-truncada na presença de amônio, resultado semelhante ao reportado para *R. capsulatus* (PASCHEN et al, 2001) em ensaio com mutante apresentando troca semelhante de resíduos. Neste caso, os autores propõem um provável efeito da mutação na interação intra ou intermolecular do domínio N-terminal e o domínio ligante de DNA. No entanto, o mecanismo mais provável da regulação da atividade de NifA, neste microrganismo, provavelmente seja devido à interação com as proteínas GlnB e GlnK (PAWLOWISKI et al., 2003) pois análises em um duplo mutante GlnB/GlnK não mostraram controle da atividade de NifA por amônio (DREPPER et al., 2003).

Nos microrganismo diazotróficos, o controle da proteína NifA em resposta aos níveis de amônio pelas proteínas do tipo PII (GlnB e GlnK) apresenta-se de forma muito particular. Em *A. brasilense*, *H. seropedicae* e *R. rubrum* GlnB é essencial para atividade de NifA sob condições limitantes de nitrogênio (BENELLI et al., 1997; DE ZAMAROCZY et al., 1993; LIANG et al., 1992; ZHANG et al., 2000). Em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*, GlnK funciona como uma proteína transdutora de sinal modulando a atividade de NifL, que inativa NifA sob condições suficientes de nitrogênio (ARCONDEGUY et al., 1999; JACK et al., 1999, LITTLE et al., 2000). Em *A. caulinodans* e *R. capsulatus*, GlnB ou GlnK não são essenciais para a ativação de NifA na presença de amônio (DREPPER et al., 2003; MASEPOHL et al 2002; MICHEL-REYDELLET & KAMINKI, 1999).

Devido a inexistência da proteína NifL e a necessidade de uma proteína do tipo PII para atividade de NifA de *H. seropedicae*, como mencionado anteriormente, é possível sugerir que se o mutante L52Q permitiu o escape da regulação por uma proteína PII, como foi observado em *R. capsulatus* (PASCHEN et al., 2001), a via de regulação por amônio mais provável deva ser semelhante àquela presente em *A. brasilense*, pois estudos recentes mostraram que uma mutação no resíduo situado adjacente ao resíduo 52, uma troca da tirosina na posição 53 por fenilalanina, permitiu

também o escape desta proteína da ação de GlnB. O domínio GAF em *A. brasilense*, que corresponde a quase a totalidade do domínio N-terminal, liga-se diretamente com a proteína GlnB (CHEN et al., 2005). Os mutantes NifA Y18F e Y53F ainda podem ligar GlnB, no entanto o duplo mutante Y18/53F apresentou uma hiperatividade com relação as mutações individuais e não é capaz de se ligar a GlnB. Estas observações permitiram sugerir que, para este microrganismo, ambos os resíduos de tirosina 18 e 53 têm um papel crítico na manutenção do efeito inibitório do domínio N-terminal na atividade de NifA. Onde a ligação de GlnB poderia então ser necessária para induzir uma mudança conformacional da proteína NifA selvagem (CHEN et al., 2005).

Outro mutante que também não inibiu a atividade de ativador transcricional da proteína NifA-N-truncada de *H. seropedicae* foi o domínio tetra mutante (plasmídeo pETLET4). Este resultado, se comparado aos obtidos com os domínios dos mutantes pELETV138E e pETLET2 (um duplo mutante) onde a baixa atividade na presença de amônio foi próxima a do selvagem, permitem sugerir que o efeito observado seja decorrente das trocas de isoleucina na posição 96 por valina e de arginina na posição 157 por histidina, uma vez que as mutações encontradas nos dois primeiros mutantes estão presentes também neste último. Entretanto não se pode descartar o efeito conjunto destas quatro mutações que podem estar causando uma mudança conformacional que iniba a interação do domínio N-terminal com a NifA N-truncada ou mesmo que permita o escape da modulação por algum ligante, mesmo tendo-se observado um alto grau de conservação do resíduo de arginina na posição 157, nos três microrganismos.

Apesar das evidências já reportadas de que GlnB seja necessária para a atividade de NifA, antagonizando o efeito inibitório do domínio N-terminal sobre a atividade de NifA em *H. seropedicae*, *A. brasilense* e *E. coli* (ARSÈNE et al., 1996; MONTEIRO, 2001, et al., 1999a e b; SOUZA et al., 1999, ARAÚJO et al., 2004) no entanto, não se pode afirmar com precisão neste trabalho, que a existência de alterações decorrentes da simples troca de resíduos de aminoácidos chaves ou de uma mudança conformacional ocorrida nestes domínios devido a uma mudança de polaridade dos aminoácidos trocados, foram suficientes para permitir o escape da modulação das proteínas do tipo PII (ARSÈNE et al., 1999; PASCHEN et al., 2001;

CHEN et al., 2005). É importante ressaltar que as análises realizadas neste trabalho foram com o domínio N-terminal GAF complementando “in trans” o domínio Central+C-terminal e que o domínio N-terminal neste caso se comporta de modo muito semelhante à proteína NifL das γ -Proteobactérias que apresenta em sua porção amino terminal o domínio PAS, contendo o grupo prostético FAD. Apesar de estarem em proteínas diferentes os domínios GAF e PAS apresentam similaridades estruturais. O domínio GAF apresenta um padrão conservado nos resíduos de aminoácidos e a predição de sua estrutura secundária sugere a presença de um centro formado por cinco folhas- β com duas hélices, similar ao visto no domínio PAS, sugerindo uma relação evolutiva e, em comum esta a capacidade do domínio GAF de ligar pequenos co-fatores (Ho et al., 2000; ANANTHARAMAN et al., 2001; HOPPER & BOCK, 1995; KANACHER et al 2002). Portanto é importante também considerar que os domínios mutantes Y18F, L52Q e o tetra mutante possam ter sofrido uma mudança conformacional que impediu a sua interação direta com o domínio Central da NifA N-truncada, ou que perderam a capacidade de captar sinais com relação aos níveis de amônio.

O domínio GAF presente na região amino-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* tem sido descrito como um domínio modulador de sinais, responsável por ligar pequenas moléculas, (ARAVIND & PONTING, 1997; ANANTHARAMAN et al., 2001) e que exerce efeitos regulatórios em domínios catalíticos adjacentes (HO et al., 2000; KANACHER et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002). Em *A. vinelandii*, a ligação de 2-oxoglutarato no domínio GAF garante que a proteína NifA não seja inibida por NifL, sob condições apropriadas para a fixação de nitrogênio (LITTLE & DIXON, 2003). Um mutante pontual apresentando a troca de fenilalanina por serina na posição 119, incapaz de ligar 2-oxoglutarato *in vitro*, mostrou-se hipersensível à inibição por NifL, permanecendo constantemente inibido sob anaerobiose e condições limitantes de N_2 (MARTINEZ-ARGUDO et al., 2004a). No entanto uma mutação adjacente, em que um resíduo de leucina na posição 120 foi substituído por uma prolina, produziu uma proteína NifA resistente a NifL em todas as condições testadas (REYES-RAMIREZ et al., 2002).

O estudo de mutantes pontuais por MARTINEZ-ARGUDO et al. (2004), mostrou ainda a habilidade discriminativa de diferentes NifAs mutantes para a formação do

complexo binário oxidado com NifL ou para a formação do complexo ternário formado com NifL e GlnK, indicando que tais complexos apresentam propriedades diferentes.

Em *E. coli*, a proteína FhlA, que também é uma ativadora de transcrição dependente do fator σ^{54} contém dois domínios GAF na região N-terminal, dependente da ligação de uma molécula de formato para a sua atividade (HOPPER & BOCK, 1995).

Para uma melhor compreensão dos mecanismos regulatórios, análises fisiológicas com a proteína NifA inteira contendo apenas as mutações no domínio N-terminal, obtidas neste trabalho, deverão ser realizadas em *H. seropedicae* mutantes *glnB* e *glnK* e em *E. coli*. Os ensaios de co-expressão do domínio N-terminal com o domínio Central+C-terminal deverá ser realizados em *E.coli* mutantes *glnB*, *glnK* e *glnB/glnK*, para confirmação de que estas proteínas presentes na estirpe de *E. coli* utilizadas neste trabalho não interferiram nos resultados obtidos, confirmando desta forma, os resultado obtidos por Monteiro (2001), que mostraram existir uma certa especificidade por parte do tipo da proteína PII, na ativação da NifA íntegra.

Os resultados deste trabalho corroboram aqueles já obtidos em trabalhos anteriores (SOUZA et al., 1999; MONTEIRO et al., 1999a, b) que mostraram que o domínio N-terminal regula a atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* em resposta aos níveis de amônio. E lança evidências de que esta regulação possa estar relacionada a determinados aminoácidos presentes neste domínio, por uma via que ainda não esta muito clara.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram obtidos domínios N-terminais com mutações pontuais e aleatórias;

Análises fisiológicas mostraram que na presença de amônio os mutantes V138E e duplo mutante apresentaram o mesmo comportamento do domínio N-terminal selvagem;

O mutante L52Q e o tetra mutante apresentaram um bloqueio na atividade inibitória do domínio N-terminal, enquanto que para o mutante Y18F este resultado foi parcial;

Os resíduos de aminoácidos trocados nos mutantes citado acima, parecem ser fundamentais para a atividade inibitória do domínio N-terminal sobre a proteína NifA N-truncada.

7. REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANANTHARAMAN, V; KOONIN, EV; ARAVIND, L. Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. **J Mol Biol.** p. 1271-92, 2001.
- ARAÚJO, L.M. et al GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escheria coli*. **Res. Microbiol**, v.155, n. 6, p. 491-5, 2004.
- ARAVIND, L; PONTING, C. P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. **Trends Biochem Sci.** p. 458-9,1997.
- ARCONDEGUY, T.; VAN HEESWIJK, W.C.; MERRICK, M. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 180, p.263-270, 1999.
- ARCONDEGUY, T., JACK, R., MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 65, n.1, p. 80-105, 2001.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4830-4838, 1996.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by PII: effect of replacing Tyr residues for the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 179, p. 339-343, 1999.
- ATIKINSON, M.; NINFA, A. J. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** v. 29, p.431-447, 1998.
- AUSTIN, S. et al. Purification and *in vitro* activities of the native nitrogen fixation control proteins NifA and NifL. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 3460-3465, 1994.
- BALDANI, J.I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BARRETT, J. et al. Concerted inhibition of the transcriptional activation functions of the enhancer-binding protein NIFA by the anti-activator NIFL. **Mol. Microbiol.** v. 39, p. 480-93.

BENELLI, E. M. et al. Evidences for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

BENELLI, E. M. et al. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.** v. 47, p. 309-314, 2001.

BERGER, D. K. et al. In vitro studies of the domains of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. **J. Bacteriol.** v. 177, p.191-199, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCHANAN-WOLLASTON, V. et al. Role of the NifA gene product in the regulation of nif expression in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, London, n. 294, p, 776-778, 1981.

BURNETTE, W. N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, v. 112, p. 195 – 203, 1981.

CANNON, F. C.; DIXON, R. A.; POSTAGATE, J. R. Derivation and properties of F-prime factors in *Escherichia coli* nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 93, p. 11-25, 1976.

CHEN S. et al.. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr-->Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Mol Gen. Genomics.** v. 273, p. 415-422, 2005.

COUTTS, G. et al. Membrane sequestration of the signal trasnduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO.** V.21 p. 1-10, 2002.

DE MEL, V. S. J. et al. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the PII protein form *E. coli* .**J. Mol. Biol.** v.243, p. 796-798, 1994

DE ZAMAROCZY, M., PAQUELIN, A., ELMERICH, C., Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** V. 178, p. 2507-15, 1993.

DIXON, R. & KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Rev. /Microbiology.** v. 2, p. 621-631, 2004.

DOBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 1-13, 1992.

DREPPER, T. et al. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase system in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Microbiology**. V. 149, p. 2203-2212, 2003.

DRUMMOND M.H., CONTRERAS A., MITCHENALL L.A. The function of isolated domains and chimaeric proteins constructed from the transcriptional activators NifA and NtrC of *Klebsiella pneumoniae*. **Mol. Microbiol.** V. 4, p. 29-37, 1990.

EADY, R. R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chem. Rev.** 96, p. 3013-3030, 1996.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Disponível em: <www21.sede.embrapa.br/a_embrapa/unidades_centrais/acs/publicações/institucional/Agroenergia.pdf> Acesso em: 04 jan. 2006.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/producao/soja/inoculacao.htm>> Acesso em: 23 jan. 2005.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Disponível em: <http://www.embrapa.br/linhas_acao/temas/meio_ambiente/nitrogenio.htm> Acesso em: 12 maio. 2005.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Disponível em: <<http://www21.sede.embrapa.br/noticias/artigos>> Acesso em: 05 jan. 2006.

EINSLE, O. et al. Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. **Science**, n. 297, 1696-1700, 2002.

ETTO, R. **Mutagenese sitio-dirigida do domínio N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae***. Curitiba, 2003. Monografia (Bacharelado em Ciências-Biológicas)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FADEL-PICHETH, C.M.T. et al. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 179, p. 281-288, 1999.

FAIRBANKS, M. Venda de fertilizantes bate recorde com apoio externo. **Química e derivados**. n. 424, mar 2004. Disponível em: <<http://www.quimica.com.br/revista/qd424/fertilizantes1.htm>> Acesso em: 10 dez. 2004.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 58, p. 352-375, 1994.

FISHER, H. M. BRUDERER, T. & HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucleic Acids Res.** n. 16, p. 2207-2224, 1988.

FOOR, F., JANSSEN, K. E MAGASANIK, B. Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by adenylylated glutamine synthetase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v.72, p. 4844-4848, 1975.

GILLES-GONZALES, M. A., DITTA, G. S. & HELINSKI, D. R. A haemprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. **Nature** 350, 170-172, 1991.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops. Research**. V. 65, p. 93-106, 2000.

GRANT, S.G.N. et al. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation- restriction mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 87, p. 4645-4649, 1990.

GREEN, J.; et al. Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro. **Biochem. J.**, v. 316, p. 887-892, 1996.

HAGEMAN, R. V. & BURRIS, R. H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. **Pro. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 75, p. 2699-2702, 1978.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** v. 41p. 95-98, 1999.

HALBLEIB, C. M. ZHANG, Y. & LUDDER, O.W. Regulation of dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase by a redox-dependent conformational change of nitrogenase Fe protein. **J. Biol.Chem.** 275, p3493-3500, 2000.

HE, L.;et al. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, p. 6661-6667, 1998.

HILL, S. et al. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen fixation genes via redox-sensitive switch. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 93, p. 2143-2148, 1996.

HO Y. S., BURDEN L.M., HURLEY J.H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **EMBO J.** p. 5288-99, 2000.

HOPPER S, BOCK A. Effector-mediated stimulation of ATPase activity by the sigma 54-dependent transcriptional activator FHLA from *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 177, p. 2798-2803, 1995.

HUERGO, L. F. et al. Effect of the over-expression of PII and PZ proteins on the nitrogenase activity of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 253, n. 1, p. 47-54, 2005.

JACK, R.; ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181, n. 4, p. 1156-1162, 1999.

JAVELLE, A. et al. In vivo functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. **J. Biochem.** v. 390, p. 215-222, 2005.

KAMBEROV, E.S.; ATKINSON, M.R.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 270, p. 17797-17807, 1995

KANACHER T. et al GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. **EMBO J.**, n. 21, p. 3672-80, 2002.

KLASSEN, G., Control of nitrogenase reactivation by the GlnZ protein in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 183, p. 6710-6713, 2001.

KLEINER, D.; PAUL, W.; MERRICK, M. J. Construction of multicopy expression vectors for regulated over-production of proteins in *Klebsiella pneumoniae* and other enteric bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 779-1784, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, (Lond.), v. 277, p. 680-685, 1970.

LEE, H. S. et al. Activity of purified NifA, a transcriptional activator of nitrogen fixation genes. **Proc. Natl. Sci. Acad. USA.**, v. 90, p. 2266-2270, 1993.

LING, M. M. & ROBINSON, B. H. Approaches to DNA Mutagenesis: an Overview. **Anal. Biochem.** v. 254, p 157-178, 1997.

LIANG, Y.Y.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* SP7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Mol. Microbiol.** v. 5, p. 2735-2744, 1991.

LIANG, Y.Y. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 100, p. 113-120, 1992.

LIN-GOERKE J.L., ROBBINS D.J., BURCZAK J.D. PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p. 409-412, 1997.

LITTLE, R. et al. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. **EMBO J**, v.19, p. 6041-6050, 2000.

LITTLE, R. et al. Direct interaction of NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p.15472-15481, 2002.

LITTLE, R & DIXON, R. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 28711-28718, 2003.

MACHADO, I.M.P. et al. O. Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 29, n.12, p.1599-1602, 1996.

MARTINEZ S. E., BEAVO J. A, HOL W. G. The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. **Proc Natl Acad Sci U S A.** p.13260-5, 2002.

MARTINEZ-ARGUDO I, LITTLE R, DIXON R. Role of the amino-terminal GAF domain of the NifA activator in controlling the response to the antiactivator protein NifL. **Mol. Microbiol.** v. 56, p.1731-1744, 2004a.

MARTINEZ-ARGUDO I. et al. The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. **J. Bacteriol.** p. 601-610, 2004b.

MASEPOHL, B.; KLIPP, W.; PÜHLER, A. Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 212, p. 27-37, 1988.

MASEPOHL, B. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** v. 4, p 243-248, 2002.

MERRICK, M. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. **Biological nitrogen fixation.** New York: Chapman & Hall, 1992.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A.. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol. Rev.** v. 59, p. 604-622, 1995.

MESSING, J. et al. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insert of a HindIII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74, 3642-3646, 1977.

MICHEL-REYDELLET, N. & KAMINSKI, A. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation. **J. Bacteriol.** v. 181, n. 8, p. 2655-2658, 1999.

MILLER, J. H. **A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

MONEY, T. et al Protein-protein interactions in the complex between the enhancer binding protein NifA and the sensor NifL from *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.** v. 183, p. 1359-1368, 2001.

MONTEIRO, R. A. et al. Expression and functional analysis of a N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.** v. 447, p. 283-286, 1999a.

MONTEIRO, R. A. et al. In-trans regulation of the N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 180, p. 157-161, 1999b.

MONTEIRO, R.A. et al. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Lett.** v. 508, p. 1-4, 2001.

MONTEIRO, R.A. et al. Fnr is involved in oxygen control of *Herbaspirillum seropedicae* N-truncated NifA protein activity in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiol.**, v. 69, n. 3, 2003.

MORET, E.; BUCK, M. NifA dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 9401-9405, 1988.

NEGRÃO, L.C.P. & URBAN, M.L. P. Alcool como "Commodity" internacional. **Economia e Energia**, n. 47, p. 8, 2005.

NINFA, E. et al. Mechanism of autophosphorylation of *E. coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): trans-phosphorylation between subunits. **J. Bacteriol.** v. 175, P. 7024-7032, 1993.

NOINDORF, L. et al. Characterization of the *orf1glnKAmB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.** v. 185, p. 55-62, 2005.

OLIVARES, F.L. et al. Infection of sugarcane roots by the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS - THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION. BODDEY, R. M.; DE RESENDE, A.S. (eds.) EMBRAPA, p. 65-66, 1995.

OLIVARES, F.L. et al. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol.**, Cambridge, v. 135, p. 723-737, 1997.

OLIVER, G. et al. Determination of the nucleotide sequence for the glutamate synthase

structural genes of *Escherichia coli* K-12. **Gene**, n. 60, p. 1-11, 1987.

PAWLOWSKI, A. et al. Yeast two-hybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **J. Bacteriology**, v. 185, p. 5240-5247, 2003.

PASCHEN, A. et al. *Rhodobacter capsulatus* NifA mutants mediating *nif* gene expression in the presence of ammonium. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 200, p. 207-213, 2001.

PEDROSA, F. O. et al. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnology**, v. 91, p. 189-195, 2001.

POSTGATE, J.R. Nitrogen Fixation. **Phil Trans. R. Soc. Lond.**, p.12-22, 1998.

REYES-RAMIREZ F, LITTLE R, DIXON R. Mutant forms of the *Azotobacter vinelandii* transcriptional activator NifA resistant to inhibition by the NifL regulatory protein. **J Bacteriol.** v. 184, p. 6777-6785, 2002.

RICE, P.A.; YANG, S.; MIZUCHI, K. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein induced DNA U-turn. **Cell**, v. 87, p. 1295-1306, 1996.

RONSON, C.W.; NIXON, B.T.; AUSUBEL, F.M. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. **Cell**, v. 49, p. 579-581, 1987.

RONCATO-MACCARI, LDB. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **Fems Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003.

RUDNICK, P. et al. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil. Biol. Biochem.** v. 29, n. 5/6, p. 831-841, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

SANGER, F. et al. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHMITZ, R.A. NifL of *Klebsiella pneumoniae* carries an N-terminally bound FAD cofactor, which is not directly required for the inhibitory function of NifL. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 157, p. 313-318, 1997.

SCHINDELIN, H. Structure of ADP x ALF₄⁻ stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. **Nature**, v. 387, p. 370-376, 1997.

SEEFELDT, L. C., DANCE, I. G.; DEAN, D. R. Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo. **Biochemistry**, n. 43, 1401-1409, 2004.

SOUZA, E. M. et al. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 37, p. 425-429, 1991a.

SOUZA, E.M. et al. Sequence and structural organization of a *nifA*- like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 137, p.1511-1522, 1991b.

SOUZA, E. M. ET AL. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, Washington, vol. 181(2), p. 681-684, 1999.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U.; MACHADO, H.B.; YATES, M.G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v.146, p.1407-1418, 2000.

STIPS J. et al. GlnK effect complex formation between NifA and NifL in *Klebsiella pneumoniae*. **Eur. J. Biochem.** V. 271, p. 3379-3388, 2004.

STUDHOLME D. J., DIXON R. Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. **J Bacteriol.** p. 1757-67, 2003

TABOR, S.; RICHARDSON, C.C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p. 1074-1078, 1985.

TAYLOR, B. L. & ZHULIN, I. B. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 63, 479-506, 1999.

TEIXEIRA, C. G. et al. Produção de álcool etílico de colmos de sorgo sacarino em microdestilaria. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 16, Belo Horizonte, MG, 1986. **Anais.** Sete Lagoas, MG, EMBRAPA/CNPMS, p.128-149, 1988.

THOMPSON, J. D. et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

THOMAS, G., COUTTS, G., MERRICK, M. The *glnKamtB* operon: a conserved gene pair in prokaryotes. **Trends Genet.**, v. 16, p11-14, 2000.

TUCKERMAN, J. R. et al. Ligand and oxidation-state specific regulation of the heme-based oxygen sensor FixL from *Sinorhizobium meliloti*. **Biochemistry** 41, 6170-6177, 2002.

TULI, R.; MERRICK, M. J. Over-production e characterization of the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumoniae* the transcription activator of *nif* gene expression. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, p. 425-432, 1988.

WASSEM, R. et al. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 35, p. 756-764, 2000.

WASSEM, R. et al. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 212, p. 177-182, 2002.

YAMASHITA, M. M. et al. Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. **J. Biol. Chem.** n. 26, p. 17681-17690, 1989.

ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 2507-2515, 1993.

ZHANG Y et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol Lett.** v. 15, n.152 (2), p. 195-204, 1997.

ZHANG, Y. et al. Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA*, and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 983-992, 2000.

ZHOU, M. Y., GOMEZ-SANCHEZ, C.E. Universal TA cloning. **Curr Issues Mol biol.** v. 2, n. 1, p. 1-7, 2000.

